

Aus der Klinik für Innere Medizin,
Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Th. M. Gress
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



**Wirkung von CUX1 und CD34 in Stromazellen
auf das Migrations- und Proliferationsverhalten
von Pankreaskarzinom-Zelllinien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Silke Renner
aus Reutlingen

Marburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am: 19.04.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Rothmund
Referent: PD Dr. Michl
1. Korreferent: Prof. Dr. Moll

Es bildet ein Talent sich in der Stille,
sich ein Charakter in dem Strom der Welt.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.2 Tumor-Stroma-Interaktion.....	4
1.3 CUX1	8
1.4 CD34.....	11
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
 2. Material	 14
2.1 Geräte.....	14
2.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien.....	15
2.3 Lösungen	19
2.4 Plasmid-DNA	23
2.5 Antikörper.....	25
2.6 Oligonukleotide	25
2.7 siRNA	26
 3. Methoden.....	 27
3.1 Zellkulturtechniken.....	27
3.2 Proteinchemische Methoden.....	32
3.3 Molekularbiologische Methoden	35
3.4 Genexpressionsprofilanalyse	38
3.5 Stimulationsversuche.....	39
3.6 Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay	39
3.7 Proliferationsanalysen	41
3.8 Immunfluoreszenz	43
3.9 Statistik	45

4. Ergebnisse	46
4.1 Effekte der Kokultur von Pankreaskarzinomzellen mit Stromazellen auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen.....	46
4.2 Versuchsreihe mit CD34	47
4.3 Versuchsreihe mit CUX1.....	53
5. Diskussion.....	62
5.1 Mesenchymale Stromazellen fördern Migration der Pankreaskarzinomzellen	63
5.2 Wirkung von CD34 ⁺ -Fibroblasten auf die Migration und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen.....	64
5.3 Wirkung von CUX1 in mesenchymalen Stromazellen auf die Migrationsrate von Pankreaskarzinomzellen.....	66
5.4 Expression von CUX1 in Entzündungszellen und die Wirkung von TGF- β auf diese CUX1-Expression	67
5.5 Wirkung von CUX1 in Makrophagen auf die Migration und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen.....	69
6. Zusammenfassung	73
Abstract	75
7. Literaturverzeichnis	77
8. Anhang.....	94
8.1 Abkürzungen und Einheiten	94
8.2 Abbildungen und Tabellen	100
8.3 Lebenslauf	102
8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	104
8.5 Danksagung	105
8.6 Ehrenwörtliche Erklärung.....	107

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Pankreaskarzinom ist eine Erkrankung, die wegen der schweren Erkennbarkeit im Frühstadium, der Invasivität und der schnellen Progression, der Resistenz gegenüber Therapien sowie der hohen Rate an Rezidiven eine schlechte Prognose hat (Bardeesy und DePinho, 2002, Li et al., 2004, Lockhart et al., 2005). Hierdurch stellt es die viert-häufigste Todesursache (6 %) unter den bösartigen Tumoren dar. Jedes Jahr erkranken in den USA ca. 37000 Menschen am Pankreaskarzinom und fast die gleiche Anzahl ver-stirbt an dieser Erkrankung (Jemal et al., 2007). Die 1 Jahr-Überlebensrate beträgt ca. 20 %, die 5 Jahres-Überlebensrate liegt unter 5 %, da 70-80 % der Patienten bei Diag-nosestellung bereits Metastasen haben (Beger et al., 2003, Alberts et al., 2007).

Die Inzidenz der Krankheit steigt mit zunehmendem Alter, so dass das Pankreaskarzi-nom im Allgemeinen als eine Erkrankung des älteren Menschen angesehen werden kann. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt zwischen 65-89 Jahren (Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2009). Weitere demografische Faktoren, die das Pankreaskarzi-nom begünstigen, sind die schwarze Rasse, jüdische Herkunft und das männliche Ge-schlecht (Li et al., 2004, Lillemoe et al., 2000).

Als Hauptrisikofaktor gilt das Rauchen. Rauchen verdoppelt das relative Risiko an ei-nem Pankreaskarzinom zu erkranken (Lowenfels und Maisonneuve et al., 2006, Yeo, 2002, Boffetta, P. et al., 2005). Aber auch fettreiche Kost, Adipositas, Diabetes mellitus sowie chronische Pankreatitis gelten als Risikofaktoren (Ghadirian et al., 2003, Maisonneuve und Lowenfels, 2002, Andren-Sandberg et al., 1999, Huxley, R. et al., 2005).

Eine genetische Prädisposition besteht bei bis zu 10 % der Patienten mit einem Pankre-askarzinom, wobei insbesondere das Peutz-Jeghers-Syndrom, die hereditäre Pankreati-tis, das familiäre Pankreaskarzinom (ca. 3 %) sowie das familiäre Mamma- und Ovari-alkarzinom und (FAMMM)-Syndrom (familiäres atypische multiple Muttermal und Melanom) mit einer erhöhten Inzidenz einhergehen (Koorstra et al., 2008, Lynch et al., 2001, Rieder et al., 2004, Bardeesy et al., 2002, Lowenfels et al., 1997).

1.1.2 Pathologie

Ca. 75 % der bösartigen Pankreasveränderungen entstehen im exokrinen Pankreas (Lillemoe, et al., 2000). In 90 % der Fälle werden diese histologisch als duktale Adenokarzinome klassifiziert. Im Pankreaskopf sind 70 % der Pankreaskarzinome lokalisiert, 25 % betreffen den Pankreaskörper und rund 5 % befinden sich im Schwanzgebiet (Classen et al., 2004, de Braud et al., 2004, Brand, 2004).

Die Tumorgenese des Pankreaskarzinoms besteht, ähnlich wie bei kolorektalen Neoplasien, aus einem mehrstufigen Prozess. Die Tumorzelltransformation weist fortschreitende histologische Veränderungen des Epithels auf, die sogenannten PanIN-Läsionen (Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien). Das stufenweise Modell des PanIN-Progressionprozesses ist schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt. Die Prävalenz der genetischen Veränderungen erhöht sich mit der steigenden Anzahl an zytologischen und architektonischen Atypien in den dukталen Läsionen (Hruban et al., 2001). Es kommt zu einer Abfolge von aktivierenden und inaktivierenden Mutationen bei Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparaturgenen (Sohn, 2002, Li et al., 2004). Das am häufigsten, in bis zu 90 % der Fälle, aktivierte Onkogen ist das K-ras Gen. Bei den Tumorsuppressorgenen sind p16 (27-93 %), p53 (40-75 %) und MADH4 (55 %) inaktiviert (Brand, 2004). MADH4, auch SMAD4 oder DPC4, kodiert für ein Protein mit weitreichenden Auswirkungen auf die Signaltransduktion, die durch die Bindung von TGF- β an die Zelloberfläche in Gang gesetzt wird. Der Verlust von MADH4 führt zu einem erhöhten Wachstum von Tumorzellen durch Hemmung proapoptotischer Signale und einem gestörten G1/S-Phasenübergang (Saif et al., 2007, Massague et al., 2000).

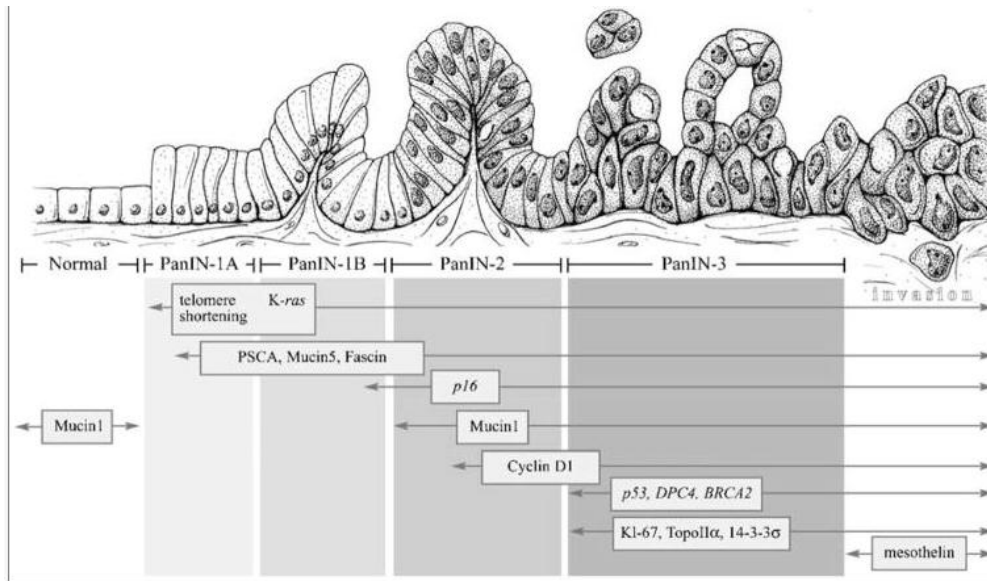


Abb. 1.1 Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms.

Die Epithelzellen des Pankreasganges werden zu invasiven Tumorzellen (von links nach rechts) über eine Reihe von histologisch definierten Vorstufen (PanINs). Die Überexpression von HER-2/neu und Punktmutationen im K-ras-Gen treten früh auf, die Inaktivierung des p16 Gens in einem Zwischenstadium und die Inaktivierung von p53, DPC4 und BRCA2 kommen relativ spät hinzu (Koorstra et al., 2008).

1.1.3 Symptomatik

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind 80 % der dukalen Adenokarzinome des Pankreas entweder nicht mehr resektabel oder metastasiert (Saif et al., 2007). Unspezifische Symptome der Patienten stellen abdominale Schmerzen, teilweise ausstrahlend in den Rücken, Übelkeit, Erbrechen, Schlafstörungen, Anorexie und generelles Unwohlsein, dar (Brand, 2004, Porta et al., 2005).

Bei Tumoren im Kopf- und Körperbereich des Pankreas sind Symptome oftmals durch Kompression umgebender Strukturen bedingt. Ein schmerzloser Ikterus, häufig begleitet durch Juckreiz, tritt vor allem bei Pankreaskopftumoren auf. Diesen posthepatischen Ikterus präsentieren 50-60 % der Patienten bei Diagnosestellung (Wray et al., 2005). Weitere Folgen der Obstruktion des Pankreas- oder Gallengangs sind Malabsorption und Steatorrhoe (Classen et al., 2004). Bei 10 % der Patienten stellt das Neuauftreten eines Diabetes mellitus das Erstsymptom dar, aber auch Pankreatitis kann das erste Zeichen einer Neoplasie des Pankreas sein (de Braud et al., 2004).

1.1.4 Diagnostik, Staging und Therapie

Aufgrund der fehlenden Frühsymptomatik werden die meisten Tumoren des Pankreas erst ab einer Größe von 3 cm diagnostiziert (Protiva et al., 2001). Die initiale Diagnostik

beinhaltet die Bestimmung von Laborparametern, um eine Cholestase oder Leberbeteiligung zu verifizieren (Lillemoe et al., 2000). Die Messung des Tumormarkers CA19-9 dient der Verlaufskontrolle. Zur bildgebenden Diagnostik wird hauptsächlich ein abdomineller Ultraschall und/oder CT durchgeführt (Alberts et al., 2007). Das Ziel der Bildgebung ist das Staging des Primärtumors mit Evaluation der Resektabilität, da Patienten, bei denen der Tumor in umliegende Gefäße infiltriert bzw. Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen vorliegen, von einer Operation nicht profitieren, sondern Kandidaten für eine palliative Chemo- und/ oder Radiochemotherapie sind.

Die einzige Therapie, die eine Kuration des Pankreaskarzinoms darstellt, ist die operative Entfernung des Tumors. Dies ist jedoch nur in 10-15 % der Fälle möglich, wenn der Tumor umliegende große Gefäße noch nicht infiltriert hat (Beger et al., 2003). In der Regel wird eine partielle Duodenopankreatektomie bzw. pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie durchgeführt, aber auch eine distale oder totale Pankreatektomie kommen je nach Lokalisation des Tumors in Frage (Kim, 2008). Trotz einer Entfernung des Tumors im gesunden Gewebe (R0) und einer erweiterten Lymphknotendisektion (N0) beträgt die 5 Jahres-Überlebensrate nur 20-30 % (Hohenberger und Kastl, 2000). Da die Erfolgsquote für eine Kuration nach einer Resektion so niedrig ist, sollte jedem Patienten eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU oder Gemcitabin angeboten werden, da sich dadurch das mediane Überleben signifikant verlängert (Beger et al., 2003).

Ist eine Kuration auf Grund der Ausbreitung über die Organgrenzen hinaus nicht mehr möglich, sollte eine palliative Therapie im Vordergrund stehen (Cohen et al., 2000, Bohmig und Rosewicz, 2004, Burris, 2005).

1.2 Tumor-Stroma-Interaktion

Morphologisch ist das duktales Pankreaskarzinom durch ein prominentes kollagenreiches Tumorstroma, auch Desmoplasie genannt, charakterisiert (Kleeff et al., 2007, Ryu et al., 2001). Das Tumorstroma bildet ein komplexes und dynamisches System, dessen Bildung und Zusammensetzung durch Signale der Tumorzellen, der Reaktivität der ortsständigen Zellen, Rekrutierung von Zellen und Produktion von Extrazellulärmatrix gesteuert wird (Chu et al., 2007, Muerkoster et al., 2004, Mueller und Fusenig, 2002).

Der Hauptteil des Tumorstromas wird aus mesenchymalen Zellen, wie Fibroblasten und Sternzellen, Endothelzellen von Gefäßen, Perizyten, Entzündungszellen und Zellen des

Immunsystems, umgeben von extrazellulärer Matrix, gebildet (Ghaneh et al., 2008). Die Interaktion zwischen neoplastischen Pankreasepithelzellen und den zellulären und nichtzellulären Stromakomponenten beeinflusst Wachstum (Hartel et al., 2004, Miyamoto et al., 2004), Migration, Invasion, Angiogenese und immunologische Erkennung des Pankreaskarzinoms (Kleeff et al., 2007). Die Kommunikation zwischen den Zellen erfolgt hierbei unter anderem durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteasen und anderen bioaktiven Molekülen (Ariztia et al., 2006). Insgesamt wird durch die Interaktion von Pankreaskarzinomzellen und ihrer Mikro- und Makroumgebung das Tumorwachstum begünstigt und der Tumor vor dem Immunsystem geschützt (Abb. 1.2), (Bissell und Radisky, 2001).

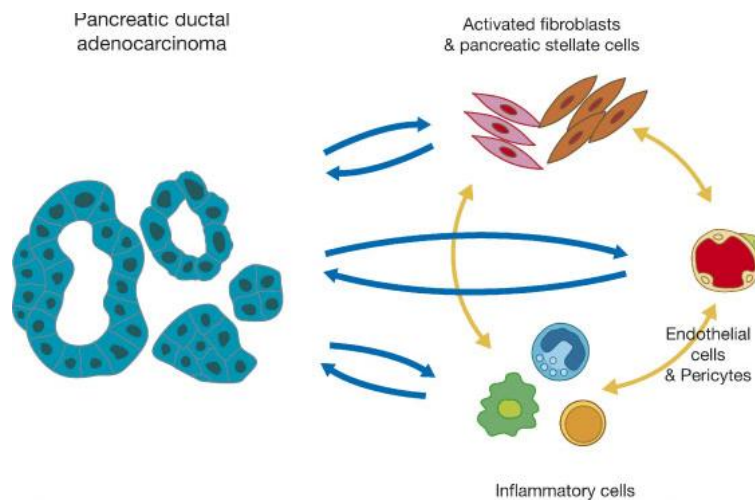


Abb. 1.2 Interaktion zwischen Pankreaskarzinomzellen und Zellen des Tumorstromas.

Karzinomzellen produzieren Wachstumsfaktoren und ECM-modifizierende Matrix-Metalloproteinasen, welche die Angiogenese, Proliferation von Fibroblasten, ECM-Proliferation und Rekrutierung von Immunzellen stimulieren. Umgekehrt können diese Komponenten über eine parakrine Feedback-Schleife die Proliferation und Invasivität der Karzinomzellen stimulieren (Chu et al., 2007).

1.2.1 Mesenchymale Stromazellen

Während der Entwicklung und Progression des Adenokarzinoms des Pankreas werden pankreatische Sternzellen bzw. Fibroblasten aktiviert, die dann Myofibroblasten genannt werden. Diese produzieren Extrazellulärmatrix, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine, geben ein modulierendes Feedback an den Tumor und interagieren mit den Entzündungszellen und Zellen der Angiogenese. Sie werden durch geschädigte Zellpopulationen des Pankreasgewebes, durch von Entzündungszellen und neoplasti-

schen Zellen produzierte Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert (Chu et al., 2007, Korc, 2007, Omary et al., 2007).

1.2.2 Makrophagen

Solide Tumore, wie das Adenokarzinom des Pankreas, werden infiltriert von einer großen Masse an Leukozyten infiltriert. Die am häufigsten auftretenden Subtypen sind Lymphozyten und Makrophagen (Sica et al., 2008a, Sica et al., 2006, Beyer und Schultze, 2008). Die Entzündungszellen werden durch von den Tumorzellen produzierte Mediatoren in das Gewebe rekrutiert (Esposito et al., 2004, Porta et al., 2005, Tajima et al., 2008). Die in das Tumorgewebe infiltrierenden Monozyten werden dort zu ortsständigen Makrophagen. Im Tumorgewebe können zwei Phänotypen von Makrophagen detektiert werden, welche zwei konträre Funktionen haben. Einerseits können diese die Etablierung und Ausbreitung der Tumorzellen verhindern, andererseits unterstützen sie das Tumorwachstum und die Tumorzell-Dissemination (Abb. 1.3), (Sica et al., 2008b, Biswas et al., 2008, Montuenga et al., 2007). Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) haben einen direkten Einfluss auf das Tumorwachstum, indem sie Angiogenese, Überleben der Tumorzellen und Metastasierung fördern (Pollard, 2004, Lewis und Pollard, 2006, Porta, 2007). Condeelis und Pollard beschreiben sechs Merkmale der Malignität, die durch Makrophagen beeinflusst werden und die Tumorzellinzidenz, Progression und Metastasierung unterstützen. Dazu gehören chronische Entzündung, Matrixumbau, Tumorzellinvasion, das Auswandern der Tumorzellen in Blutgefäße, Angiogenese und Metastasierung (Condeelis und Pollard, 2006).

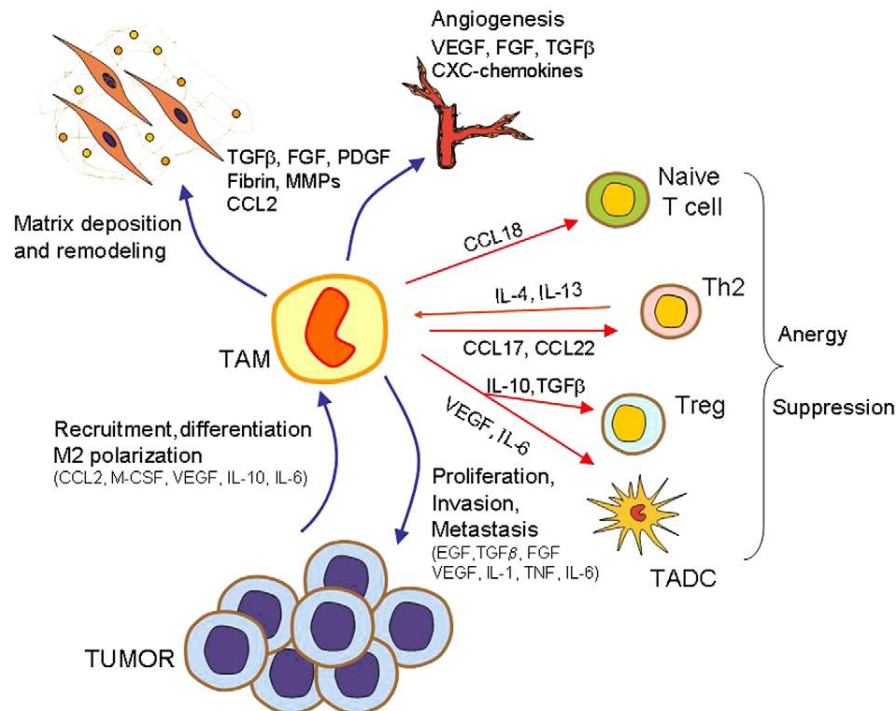


Abb. 1.3 Tumorunterstützende Funktionen von TAM und das Zusammenspiel mit den Tumorzellen.

Rekrutierung von Monozyten durch neoplastische Zellen, die dann ortsansässig und als tumorassoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet werden. Die TAM stimulieren direkt das Wachstum der Tumorzellen, setzen proangiogenetische Faktoren frei und beeinflussen den Abbau und die Remodellierung der Extrazellulärmatrix. Zusätzlich unterdrücken sie die gegen den Tumor entstehende Immunreaktion durch Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen (IL10, TGF- β) und selektives Rekrutieren von naiven T-Zellen (CCL18) ebenso wie TH2-, Treg-Zellen (CCL17, CCL22), (Sica et al., 2008a).

1.2.3 TGF- β

Als ein zentraler Wachstumsfaktor, der die Tumorgenese des Pankreaskarzinoms und anderer Neoplasien beeinflusst, gilt das TGF- β . Der TGF- β Signalweg hat einen Einfluss auf die embryonale Entwicklung, Entzündung, Angiogenese und Ontogenese von Neoplasien (Chu et al., 2007, Massague et al., 2000, De Wever und Mareel, 2003). In prämaligen Zellen wirkt TGF- β tumorsuppressiv. Durch Mutationen von Komponenten des Signalwegs oder eine Überexpression von TGF- β in fortgeschrittenen Stadien eines Tumors fördert es die Tumorprogression (Abb. 1.4), (Mahadevan und Von Hoff, 2007, Roberts und Wakefield, 2003).

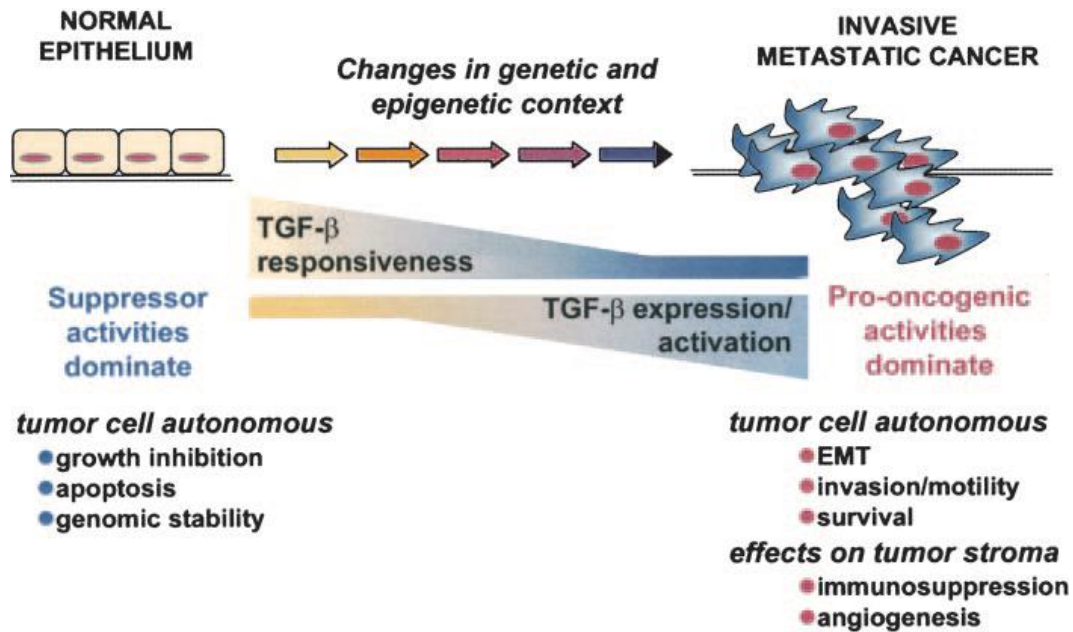


Abb. 1.4 Duale Rolle von TGF-β.

Die Effekte der TGF-β-Signale wechseln von tumorsuppressiven im prämaligen Stadium der Tumorgenese zu protoonkogenen Effekten in fortgeschrittenen Tumoren. Die Progression zu einer metastasierenden Erkrankung wird begleitet von einer abnehmenden oder veränderten TGF-β-Ansprechbarkeit der Zellen und einer erhöhten Expression bzw. Aktivierung von TGF-β (Roberts und Wakefield, 2003).

Die Mitglieder der TGF-β-Familie kontrollieren während der Tumorgenese grundlegende Vorgänge, wie Wachstum (Miyamoto et al., 2004), Invasion (Ellenrieder et al., 2001), Metastasierung (Seton-Rogers und Brugge et al., 2004), Migration (Massague, 1998), den epithelialen-mesenchymalen Übergang (Bachem et al., 2008) und die Reaktion des Immunsystems auf die entstehende Neoplasie (Hong et al., 2010).

Die Regulation der Tumorentwicklung durch TGF-β geschieht entweder auf Grund der direkten Wirkung auf die Tumorzellen oder die Beeinflussung der Interaktion zwischen Tumorzellen und Stroma. Umgekehrt können die verschiedenen Komponenten der Mikroumgebung des Pankreaskarzinoms wie Fibroblasten, Zellen des Immunsystems und die Extrazellulärmatrix, die tumorprogressiven Signale von TGF-β positiv oder negativ beeinflussen (Bierie et al., 2006a, Bierie et al., 2006b).

1.3 CUX1

CUX1 (Maus), auch Cut (*Drosophila megaloblasta*), CDP oder CUTL1 genannt, gehört zu einer Familie von Homeobox Transkriptionsfaktoren, die evolutionär konserviert sind und einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen haben (Santaguida et al., 2001, Neufeld et al., 1992, Nepveu, 2001). Im Rahmen einer verein-

fachten Nomenklatur wird von der HUGO (Human Genome Organization) empfohlen, CUTL1 nun CUX1 zu nennen, weshalb in dieser Arbeit der in der Literatur häufig verwendete Term CUTL1 durch CUX1 ersetzt wird (Human Genome Organisation, 2010). CUX1 befindet sich im Zellkern und hat eine Größe von 180-190 kDa. Es wird in verschiedenen Isoformen exprimiert, die bis zu vier DNA bindende Domänen, drei der sogenannten Cut-repeats (CR1-3) und eine Homeoboxdomäne enthalten (Harada et al., 1995, Coqueret et al., 1996, Aufiero et al., 1994). Die verschiedenen Isoformen von CUX1 haben unterschiedliche DNA-Bindungseigenschaften und regulatorische Einflüsse auf die Transkription (Abb. 1.5) (Sansregret und Nepveu, 2008). CUX1 kann die Transkription von Genen sowohl fördern (Yoon und Chikaraishi, 1994, van Wijnen et al., 1996), als auch supprimieren (Sansregret und Nepveu, 2008, Coqueret et al., 1998). Die Repression von Genen kann hierbei durch zwei Mechanismen beeinflusst werden. Einerseits kann CUX1 DNA-Bindungsstellen kompetitiv besetzen und andererseits auch eine aktive Repression bewirken (Santaguida et al., 2001, Nepveu, 2001). In *Drosophila melanogaster* wurde nachgewiesen, dass CUX1 an der Zelldifferenzierung und der Zelltyp-Determinierung beteiligt ist (Aufiero et al., 1994, Bodmer et al., 1987, Blochlinger et al., 1991, Coqueret et al., 1996).

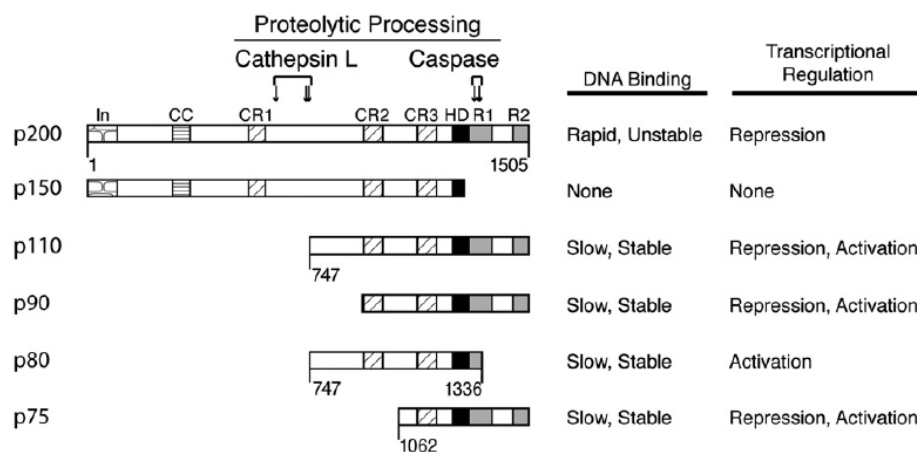


Abb. 1.5 Isoformen von CUX1, deren DNA-Bindungsaktivität und Wirkung auf die Transkription.

Während die längste Isoform (p200) nur als Transkriptionsrepressor wirkt, haben die kürzeren Isoformen auch eine aktivierende Wirkung. Die Interaktion mit der DNA wird durch die Kombination der verschiedenen DNA-Bindungsdomänen in den Isoformen beeinflusst (Sansregret und Nepveu, 2008).

1.3.1 CUX1 in der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms

Das für CUX1 kodierende Gen liegt auf Chromosom 7 q 22, einer Region, die bei der Entstehung von Tumoren regelmäßig neuangeordnet wird bzw. gelegentlich auch verloren geht, wie z.B. bei der akuten myeloischen Leukämie (Nepveu, 2001). CUX1 ist an der Zellzyklusprogression beteiligt, gleichzeitig wird die Expression und Aktivität von CUX1 durch den Zellzyklus reguliert (Martin-Soudant et al., 2000). Die DNA-Bindungsaktivität nimmt in der S-Phase des Zellzyklus stark zu, wohingegen in der G0 und frühen G1-Phase diese eher gering ist (Sansregret et al., 2006).

Michl et al. identifizierten CUX1 unter Verwendung einer „RNA interference Library“ als einen Modulator der Zellmotilität. Im Anschluss bewiesen sie den positiven Effekt von CUX1 auf die Migration und Invasivität von verschiedenen Tumorzellen in vitro und in vivo. Des Weiteren wurde deutlich, dass die Expression von CUX1 durch TGF- β erhöht wird und dass CUX1 als Mediator von TGF- β -vermittelten promigratorischen Effekten dient (Michl et al., 2005, Michl et al., 2006a).

Neben TGF- β wirken verschiedene Kofaktoren und Kinasen auf CUX1 ein (Abb. 1.6). Diese modulieren die Wirkung von CUX1 auf die Transkription, indem sie CUX1 phosphorylieren oder dephosphorylieren. Coqueret et al. untersuchten zum Beispiel die Wirkung der Proteinkinase C auf CUX1 und fanden heraus, dass diese die DNA-Bindungsaktivität von CUX1 verringert und somit auch dessen negative Wirkung auf die Transkription reduziert (Coqueret et al., 1996).

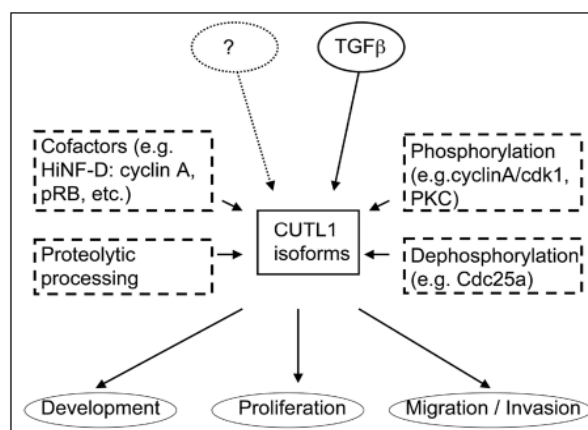


Abb. 1.6 Funktionen von CUX1 in Zusammenhang mit dem TGF- β -Signalweg.

Unter Einfluss verschiedener Kofaktoren und der Modulation durch Kinasen reguliert CUX1 die Expression von Genen, die an der Proliferation, Migration, Invasion bei der Tumorentstehung beteiligt sind (Michl et al., 2006a).

Die Bedeutung von CUX1 für die Entstehung von Karzinomen wird dadurch unterstrichen, dass es in verschiedenen epithelialen Karzinomen verstärkt exprimiert wird und negativ mit der Tumorzelldifferenzierung und dem Patientenüberleben korreliert. Immunhistochemische Analysen von Geweben verschiedener Brust- und Pankreaskarzinome zeigten eine erhöhte Expression von CUX1 in high-grade-Tumoren im Gegensatz zu low-grade-Tumoren (Michl et al., 2005, Ripka et al., 2007). Auf zellulärer Ebene ist CUX1 im Pankreaskarzinom auf Tumorzellen und Zellen des Stromas wie Fibroblasten (Sansregret und Nepveu, 2008, Michl et al., 2005) und Makrophagen (European Bioinformatics Institute (EBI), 2011) verstärkt exprimiert.

1.4 CD34

Im Jahre 1984 wurde von Civin et al. ein Oberflächenantigen - heute als CD34-Antigen bekannt - detektiert, das unreife Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems kennzeichnet (Civin et al., 1984). Seine klinische Bedeutung erhält es noch heute durch seine Verwendung bei der Markierung und Purifikation von Stammzellen bzw. Vorläuferzellen der Hämatopoese (Krause et al., 1994). Beim CD34-Antigen handelt es sich um ein 115 kDa großes glykosyliertes Transmembranprotein, das sich zu 1-4 % auf Knochenmarkszellen befindet und dessen kodierendes Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 1 (1q32) liegt (Satterthwaite et al., 1992, Krause et al., 1996). Außer auf Stammzellen der Hämatopoese wird CD34 auch auf peripheren Blutzellen, Kapillar-endothelzellen und embryonalen Fibroblasten exprimiert (Krause et al., 1996, Felschow et al., 2001). Obwohl die genaue Funktion des Proteins bislang noch unbekannt ist, gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Zelladhäsion und der Regulation der Hämatopoese (Lanza et al., 2001, Fernandez et al., 2000).

1.4.1 CD34⁺-Fibrozyten im dukalen Adenokarzinom des Pankreas

CD34⁺-Fibrozyten kommen in vielen Geweben vor. Neben dem Auftreten in gesunden Geweben wie z. B. Haut, Lunge, Herz, Gastrointestinaltrakt, Kornea, Brust und weiblichen Genitaltrakt, kommen sie in verschiedenen Tumoren der Haut und mesenchymalen Tumoren vor (Nimphius et al., 2007, Barth und Westhoff, 2007). Physiologisch sind CD34⁺-Fibrozyten einer der Hauptquellen für Kollagen-Typ I und III, auf Grund dessen sie eine wichtige Rolle bei der Wundheilung spielen. Des Weiteren haben sie die Befähigung zur Migration, Angiogenese und Präsentation von Antigenen (Abe et al., 2001, Bucala et al., 1994, Chesney et al., 1997).

Durch eine Studie von Barth et al. (2002), die das Vorkommen von CD34⁺-Fibrozyten im duktalem Adenokarzinom des Pankreas untersuchte, ist über die Verteilung der CD34⁺-Fibrozyten bekannt, dass sie im Stroma des Karzinoms fehlen und das an das Karzinom grenzende Parenchym des Pankreas durch eine vermehrte Anzahl dicht zusammenliegender CD34⁺-Fibrozyten charakterisiert ist. Der Verlust der CD34⁺-Fibrozyten im Stroma des Karzinoms wird durch das gleichzeitige Erscheinen von α -SMA positiven Myofibroblasten begleitet. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Prof. Barth legen nahe, dass CD34⁺-Fibrozyten eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Tumorzellmigration und der Beibehaltung der Integrität des Stromas spielen (Barth et al., 2002). Auch die Stroma-Modulation in Zusammenhang mit anderen invasiven Karzinomen ist durch einen vollständigen Verlust von CD34⁺-Fibrozyten charakterisiert (Nimphius et al., 2007).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der Interaktion der Tumorzellen des Pankreaskarzinoms mit den Komponenten des Tumorstromas durch produzierte Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine und andere bioaktive Moleküle kommt eine große Bedeutung bei der Tumorprogression durch Migration und Proliferation der Tumorzellen zu.

Ziel dieser Arbeit ist es, sowohl den Einfluss des Transkriptionsfaktors CUX1 in tumor-assoziierten Makrophagen und Fibroblasten als auch den Effekt der CD34⁺-Expression auf peritumoralen Fibrozyten zu untersuchen. Besonderer Fokus liegt hierbei auf der Untersuchung von Effekten auf das Migrationsverhalten und die Proliferationsrate von Pankreaskarzinomzellen durch die Ausschüttung von Mediatoren. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

CD34

Welchen Einfluss haben CD34⁺-Fibrozyten auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen?

CUX1

Welche Effekte hat CUX1 in mesenchymalen Stromazellen auf das Migrationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen?

Welchen Einfluss hat TGF- β auf die CUX1-Expression von Makrophagen?

Welche Effekte hat CUX1 in Makrophagen auf das Migrationsverhalten und Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen?

Welche Chemokine und Zytokine werden von Makrophagen nach Repression von CUX1 exprimiert? Welchen Einfluss haben diese Chemokine und Zytokine speziell auf die Migration und Proliferation der Tumorzellen?

2. Material

2.1 Geräte

	Firma	Firmensitz
2100 Agilent Bioanalyser	Agilent Technologies	Santa Clara, USA
BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg, GER
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus Instruments	Osterode, GER
5100 Cryo 1 °C Freezing Container "Mr. Frosty"	Nalgene Labware	Wiesbaden, GER
Elektrophorese Kammer Mini-Protean [®]	BioRad	München, GER
Feather Volt [™] 500	Stratagene	Cedar Creek, USA
Certomat [®]	B. Braun	Melsungen, GER
Sterilbank LaminAir HBB2448	Heraeus Instruments	Osterode, GER
Thermoblock DB2A Dri-Block [®]	Techne AG	Jahnsdorf, GER
Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, GER
MR 2000 (Magnet Rührer)	Heidolph	Schwabach, GER
Bio Photometer	Eppendorf	Hamburg, GER
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments Inc	Neu Isenburg, GER
Luminometer Centro LB 960 (Program MikroWin 2000, Version 4,36)	Berthold Technologies	Bad Wildbad, GER
Mikroskope: - Fluoreszenzmikroskop ApoTome - IMT-2	Zeiss Olympus	Oberkochen, GER Hamburg, GER
Multipipette	Eppendorf	Hamburg, GER
Nucleofector [®] Device	Amaza AG	Walkersville, USA

Zentrifugen: - Varifuge K - Biofuge pico - Kühlzentrifuge Centrifugo 5402	Heraeus Instruments Heraeus Instruments Eppendorf	Osterode, GER Osterode, GER Hamburg, GER
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems	Foster City, USA
Feinwaage Mettler PM4000	Mettler-Toledo GmbH	Gießen, GER
Vortexer MS1 Minishaker	IKA	Staufen, GER
Entwickler Curix 60 und Reagenzien (Develop, Rapid Fixer)	AGFA	Köln, GER
Unimax 2010 (Schüttler)	Heidolph	Schwabach, GER
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, GER
Pipetboy acu	Integra Biosciences IBS	Fernwald, GER
Wasserbad	GFL	Burgwedel, GER

2.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien

2.2.1 Chemikalien

	Firma	Firmensitz
Aceton	Sigma-Aldrich	St.Louis, USA
Acrylamid (Rotiphorese Gel)	Roth	Karlsruhe, GER
Agar-Agar	Roth	Karlsruhe, GER
Ampicillin	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Aqua ad iniectabilia	Diaco	Triest, ITL
APS	Serva	Heidelberg, GER
Aqua ad iniectabilia	Delta Select	Dreieich, GER
Borsäure	Fisher Scientific	Schwerte, GER
BSA	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
DAPI	Merck	Darmstadt, GER
DMSO	Roth	Karlsruhe, GER
ECL	GE Health Care	München, GER
EDTA	Roth	Karlsruhe, GER
EGTA	Roth	Karlsruhe, GER
Essigsäure	Merck	Darmstadt, GER
Ethanol absolute	Riedel-de Haen	Seelze, GER
Glucose	Serva	Heidelberg, GER
Glycerol	Merck	Darmstadt, GER
Glycin	Riedel-de Haen	Seelze, GER
HCl	Merck	Darmstadt, GER
HEPES	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
LB	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Kaliumdihydrogencarbonat	Merck	Darmstadt, GER
Kristallviolett (27335)	Serva	Heidelberg, GER
Magnesiumchlorid	Invicon	München, GER
Methanol	Sigma-Aldrich	St.Louis, USA
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, GER
Natriumchlorid	Riedel-de Haen	Seelze, GER
Na-Fluorid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Natrium-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Protease Inhibitor, Protease Arrest [100x]	G-biosciences	Houston, Texas, USA
SDS	Roth	Karlsruhe, GER
TGF- β -1	Tebu-Bio	Offenbach, GER
TEMED	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tris-Base	Roth	Karlsruhe, GER
Triton X-100	Boehringer	Mannheim, GER

Tween 20 pure	Serva	Heidelberg, GER
Zeocin TM	InvivoGen	Toulouse, FRA

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

	Firma	Firmensitz
Amersham Hyperfilm TM ECL	GE Health Care	München, GER
Einmal-Küvetten PS 1,5 ml halbmikro	Brand	Wertheim, GER
Kryogefäße	Nalgene Labware	Roskilde, DEN
Kultivierungsplatte (6,12,24,48,96 Vertiefungen)	Greiner Bio-one	Essen, GER
Microplate 96-Well, white	Berthold Technologies	Bad Wildbach, GER
Multipipette Combitips plus	Eppendorf	Hamburg, GER
Multiwell TM Primaria TM 24-Well	Becton Dickinson	Heidelberg, GER
Nobaglove-Latex	Noba	Wetter, GER
Parafilm	Brand	Wertheim, GER
PP-Test Tubes (50 ml)	Greiner Bio-one	Essen, GER
Precision Plus Protein TM Standards	Bio Rad	München, GER
PVDF-Membran, Immobilon-P	Millipore	Billerica, USA
Reagiergefäß (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, GER
Scott facial tissues	Kimberly-Clark	Surrey, UK
sterile Einmal-Pipetten	Greiner Bio-one	Essen, GER
Whatman Gel Blooting Papier	Schleicher & Schüll	Dassel, GER
Zellkulturflaschen und -schalen	Greiner Bio-one	Essen, GER
Zellschaber	Greiner Bio-one	Essen, GER
Zellkultureinsätze, Porengröße 8 µm	Becton Dickinson	Heidelberg, GER

2.2.3 Reagenziensets „Kits“

	Firma	Firmensitz
Bio-Rad Protein-Assay	BioRad	München, GER
CellTiter-Glo [®]	Promega	Mannheim, GER
Nucleofector-Kit C	Amaza AG	Walkersville, USA
Omniscript RT Kit (205110)	Qiagen	Hilden, GER
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	Foster City, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen	Hilden, GER
RNase Inhibitoren	Applied Biosys- tems/Ambion	Foster City, USA
RNeasy [®] -Mini Kit	Qiagen	Hilden, GER
RT ² First Strand Kit (C-03)	SABiosciences Corpora- tion	Frederick, USA
RT ² SYBR Green/ROX PCR Master Mix (PA-012)	SABiosciences Corpora- tion	Frederick, USA
Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors PCR Array (PAMM- 011C)	SABiosciences Corpora- tion	Frederick, USA
siLentFect [™] Lipid Reagent	Bio Rad	München, GER
TransMessenger [™] Transfection Reagent	Qiagen	Hilden, GER
Transfast	Promega	Madison, USA

2.3 Lösungen

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Kulturmedien

J774.A1-, Panc1-, Suit007-, NIH3T3-, RLT-PS-Zellen:

500 ml	Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin
50 ml	10 % FCS
2,5 ml	0,05 % Gentamycin

U937-Zellen:

500 ml	RPMI 1640
50 ml	10 % FCS
2,5 ml	0,05 % Gentamycin

Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien und ihre Zusätze wurden, wenn nicht anders vermerkt, von PAA Laboratories, Pasching, Österreich bezogen. Des Weiteren wurden in der Zellkultur Trypsin-EDTA, Dulbeco`s Phosphate Buffered Saline, verwendet.

2.3.1.2 Selektionsmedium

CD34⁺-NIH3T3-Zellen:

500 ml	RPMI 1640
50 ml	10 % FCS
2,5 ml	0,05 % Gentamycin
2000 µg/ml	Zeocin TM

2.3.1.2 Einfrierlösung

9 ml	FCS
1 ml	DMSO

2.3.2 SDS – Polyacrylamidgel-Elektrophorese

2.3.2.1 Puffer für Gesamtproteinextrakt - Lysepuffer

12,5 ml	1 M HEPES (pH 7,5)
7,5 ml	5 M Natriumchlorid
1,25 ml	200 mM EGTA
25 ml	10 % Glycin
2,5 ml	1 % Triton X-100
1,05 g	100 mM Na-Fluorid
1,115 g	10 % Natrium-Pyrophosphat x 10 H ₂ O
80 µl	Proteinase-Inhibitoren pro 2 ml Ansatz frisch hinzugeben

2.3.2.2 Lämmli-Probenpuffer (5 x)

2,25 ml	225 mM Tris/HCl (pH 6,8)
5 ml	50 % Glycerin (v/v)
2,5 ml	5 % SDS (w/v)
1 ml	100 mM DTT
	0,02 % Bromphenolblau

2.3.2.3 Sammelgel

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

12,11 g/200 ml	Tris Base
4 ml	0,4 % SDS

Sammelgel (Mengenangaben für 2 Gele)

3 ml	destilliertes Wasser
1,3 ml	Sammelgelpuffer
750 µl	30 % Acrylamid
50 µl	10 % SDS
30 µl	10 % APS
10 µl	TEMED

2.3.2.4 Trenngel

Trenngelpuffer (pH 8,8)

36,34 g/200 ml	Tris Base
4 ml	0,4 % SDS

Trenngel (10 %, Mengenangaben für 2 Gele)

4,1 ml	destilliertes Wasser
2,6 ml	Trenngelpuffer
3,3 ml	30 % Acrylamid
100 µl	10 % SDS
50 µl	10 % APS
10 µl	TEMED

2.3.2.5 Stoppgel

Mengenangaben für 2 Gele

400 µl	Trenngelpuffer
20 µl	10 % APS
20 µl	TEMED

2.3.2.6 10x-Laufpuffer

20 g	SDS
60,6 g	Tris
288 g	100 % Glycin
2 l	destilliertes Wasser

2.3.3 Western-Blot

2.3.3.1 Transfer-Puffer

151,40 g/5 l	0,25 M Tris-Base
720,65 g/5 l	1.92 M Glycin

2.3.3.2 Blotting Puffer

100 ml	10 x Transfer-Puffer
200 ml	Methanol
700 ml	destilliertes Wasser

2.3.3.3 TBS-T

TBS-Puffer (pH 7,6)

121,4 g/5 l	Tris
400,31 g/3 l	Natriumchlorid

TBS-T

100 ml	10 x TBS-Puffer
900 ml	destilliertes Wasser
1 ml	Tween 20

2.3.3.4 Blocking-Puffer

50 ml	TBS-T
5 %	Milchpulver

2.3.4 Immunfluoreszenz

2.3.4.1 PBS

8 g/l	Natriumchlorid
0,2 g/l	Kaliumchlorid
1,15 g/l	Na ₂ HPO ₄ (Natriumphosphat)
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogencarbonat)

2.4 Plasmid-DNA

Die verwendete Plasmid-DNA wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Barth selbst generiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Plasmid-DNA enthielt den Plasmidvektor pcDNA4/TO und die Sequenz des humanen CD34.

2.4.1 Plasmidvektor

Vektorbezeichnung	Resistenzen	Herkunft
pcDNA4/TO	Amp, Zeocin	Fa. Invitrogen, GER

2.4.2 Sequenz humanes CD34 (CCDS Database, 2011)

CGCGGGAAGGATGCTGGTCCGCAGGGGCGCGCGCGCAGGGCCCAGGATGCCGCGGGGCTGG
M L V R R G A R A G P R M P R G W
ACCGCGCTTTGCTTGCTGAGTTTGTCTGCCTTCTGGGTTTCATGAGTCTTGACAACAACGGTACT
T A L C L L S L L P S G F M S L D N N G T
GCTACCCCAGAGTTACCTACCCAGGGAACATTTTCAAATGTTTCTACAAATGTATCCTAC
A T P E L P T Q G T F S N V S T N V S Y
CAAGAAACTACAACACCTAGTACCCTTGGAAGTACCAGCCTGCACCCTGTGTCTCAACAT
Q E T T T P S T L G S T S L H P V S Q H
GGCAATGAGGCCACAACAAACATCACAGAAACGACAGTCAAATTCACATCTACCTCTGTG
G N E A T T N I T E T T V K F T S T S V
ATAACCTCAGTTTATGGAAACACAAACTCTTCTGTCCAGTCACAGACCTCTGTAATCAGC
I T S V Y G N T N S S V Q S Q T S V I S
ACAGTGTTTCACCACCCCAGCCAACGTTTCAACTCCAGAGACAACCTTGAAGCCTAGCCTG
T V F T T P A N V S T P E T T L K P S L
TCACCTGGAAATGTTTCAGACCTTTCAACCACTAGCACTAGCCTTGCAACATCTCCCACT
S P G N V S D L S T T S T S L A T S P T
AAACCCTATACATCATCTTCTCCTATCCTAAGTGACATCAAGGCAGAAATCAAATGTTCA
K P Y T S S S P I L S D I K A E I K C S
GGCATCAGAGAAGTGAAATTGACTCAGGGCATCTGCCTGGAGCAAAATAAGACCTCCAGC
G I R E V K L T Q G I C L E Q N K T S S
TGTGCGGAGTTTAAGAAGGACAGGGGAGAGGGCCTGGCCCGAGTGCTGTGTGGGGAGGAG
C A E F K K D R G E G L A R V L C G E E
CAGGCTGATGCTGATGCTGGGGCCCAGGTATGCTCCCTGCTCCTTGCCCAGTCTGAGGTG
Q A D A D A G A Q V C S L L L A Q S E V
AGGCCTCAGTGTCTACTGCTGGTCTTGGCCAACAGAACAGAAATTTCCAGCAAACCTCAA
R P Q C L L L V L A N R T E I S S K L Q
CTTATGAAAAAGCACCAATCTGACCTGAAAAAGCTGGGGATCCTAGATTTCAGTACGAGCAA
L M K K H Q S D L K K L G I L D F T E Q
GATGTTGCAAGCCACCAGAGCTATTCCCAAAGACCCTGATTGCACTGGTCACCTCGGGA
D V A S H Q S Y S Q K T L I A L V T S G
GCCCTGCTGGCTGTCTTGGGCATCACTGGCTATTTCTGATGAATCGCCGCAGCTGGAGC
A L L A V T G I T G Y F L M N R R S W S
CCCACAGGAGAAAGGCTGGAGCTGGAACCTGA
P T G E R L E L E P

2.5 Antikörper

primäre Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Anti- β -Aktin	Maus	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)	1:1000
Anti-CUTL1 (monoclonal)	Kaninchen	Abnova (Heidelberg, GER)	1:1000
Anti-CD34 (My10)	Maus	Becton Dickinson (San Jose, USA)	1:100
QBEND10	Maus	Abcam (Cambridge, UK)	1:40
sekundäre Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Anti-Mouse IgG	Kaninchen	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)	1:10000
Rabbit Anti-Goat IgG (H+L)	Esel	Jackson ImmunoResearch Lab. (Suffolk, UK)	1:10000

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 Primer für Taqman

Die Primer wurden von biomers.net (Ulm, GER) bezogen.

Bezeichnung	Sequenzen
mCUTL1_for	5`-GACGTGTTGCGCACTTAACG-3`
mCUTL1_rev	5`-ACGACATAGATTGGGCTTAATGCT-3`
xs13_Taq for	5`-GTCGGAGGAGTCGGACGAG-3`
xs13_Taq rev	5`GCCTTTATTTTCCTTGTTTTGCAAA-3`

2.7 siRNA

Es wurde folgende siRNA verwendet:

Bezeichnung	Sequenz	Herkunft	Firmensitz
mCUTL 1_2	5`-GGUUCUGGAAUAACUCUUU-3`	Applied Bio-systems	Darmstadt, GER
hCUTL 1_3	5`-GGAACAGAAGUUACAGAAU-3`	Applied Bio-systems	Darmstadt, GER
Negativkontrolle	Silencer Negative Control # 1 siRNA	Applied Bio-systems	Darmstadt, GER

3. Methoden

3.1 Zellkulturtechniken

3.1.1 Zelllinien

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Zelllinien und deren Abstammung sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1 Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Herkunft	Medium
Panc1	humane Pankreas- karzinom-Zelllinie	CAMR Centre for Applied Microbiology & Research (ECACC, Salisbury, Wiltshire)	DMEM + 10 % FCS
Suit007	humanes Adenokar- zinom (Lebermetastase)	T. Iwamura Department of Surgery I, Miyazaki Medical College (Miyazaki, Japan)	DMEM + 10 % FCS
J774.A1	Retikulumzellsarkom der Maus (Makrophagen)	CAMR Centre for Applied Microbiology & Research (ECACC, Salisbury, Wiltshire)	DMEM + 10 % FCS
U937	humanes Burkitt- Lymphom	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, GER)	RPMI 1640 + 10 % FCS
RLT-PSC	immortalisierte primär humane pankreatische Sternzellen	Prof. Dr. Löhr, Klinischen Kooperationseinheit für Molekulare Gastroenterologie, DKFZ, Heidelberg, GER (Jesnowski et al., 2005)	DMEM + 10 % FCS
NIH3T3	embryonale Fibroblasten der Maus	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, GER)	DMEM + 10 % FCS

3.1.2 Subkultivierung von Zelllinien

Die Handhabung der Zellen erfolgte unter einer sterilen Arbeitsbank mit sterilen Lösungen und Arbeitsmaterialien. Zur Herstellung des Nährmediums wurden den Basismedien RPMI (U937-Zellen) oder DMEM (NIH3T3-, RLT-PS-, J774.A1-, Suit007-, Panc1-Zellen) 0,05 % Gentamycin und 10 % FCS zugefügt. Alle 3-4 Tage wurde zur Subkultivierung der adhärennten Zellen das verbrauchte Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS erfolgte die Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA zur Ablösung des 50-80 % dichten Zellrasens. Die Inkubationszeit bei 37 °C mit Trypsin betrug je nach Zelllinie zwischen 1-10 Minuten. Anschließend wurde das Zell-Trypsin-Gemisch in ein mit 5 ml Nährmedium gefülltes Falconröhrchen überführt und für 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in neues Nährmedium. Je nach gewünschter Verdünnung wurde ein Teil dieses Nährmedium-Zellgemisches in eine mit Nährmedium gefüllte Einweg-Zellkulturflasche transferiert. Die Subkultivierung der Zelllinie U937 erfolgte gesondert, da es sich hierbei um Suspensionszellen handelt. Hierzu wurde alle 4-5 Tage entweder frisches RPMI-Medium in die Zellkulturflasche hinzugefügt oder die Zellen zentrifugiert und anschließend auf eine Konzentration von $1-2 \times 10^5$ Zellen mit Standardmedium resuspendiert. Anschließend wurden die verwendeten Zelllinien in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gezüchtet.

3.1.3 Zellzahlbestimmung

Für Experimente, die eine gleichmäßige Zelldichte voraussetzten, musste die Zellzahl bestimmt werden. Dies erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde eine Probe eines in Nährmedium suspensierten Zellpellets an den Rand des Deckglases der Zählkammer pipettiert und die Zellen in vier Eckquadraten gezählt. Um die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen, wurde der Mittelwert mit dem Faktor 1×10^4 multipliziert. Auf Grundlage der ermittelten Zellzahl konnten die Zellen gleichmäßig für folgende Experimente auspipettiert werden.

3.1.4 Kryokonservierung der Zellen

Das Einfrieren von Zellen in flüssigem Stickstoff diente dazu, jederzeit ausreichend Zellen zur Verfügung zu haben. Die so gewonnenen Zellreserven konnten bei -180 °C über einen längeren Zeitraum konserviert werden, ohne dass deren Lebensfähigkeit beeinträchtigt wurde.

Hierzu wurde wie in 3.1.2 beschrieben ein Zellpellet gewonnen. Dieses wurde in FCS und 10 % DMSO resuspendiert und jeweils 1 ml dieses Aliquotes in ein Kryogefäß gegeben. Die Kryogefäße wurden in einen speziellen Kryo-Container eingebracht und dieser dann über Nacht bei -80 °C gelagert. Durch das sich im Container befindliche 100 % Propanol wurde ein kontinuierliches Abkühlen der Zellen um 1 °C pro Minute gewährleistet. Nach 24 Stunden erfolgte die Überführung in einen -180 °C kalten, mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank. Auf Grund des Lösungsmittels DMSO bildeten sich beim Einfrieren nur kleine Eiskristalle und die Zellwände wurden nicht beschädigt. Damit die, durch DMSO bewirkte, erhöhte Permeabilität der Zellmembran die Zellen nicht schädigt, sorgte der hohe Serumgehalt der Lösung dafür, dass die Proteinkonzentration intra- und extrazellulär gleich blieb.

3.1.5 Auftauen der Zellen

Wurden für die Experimente neue Zellen benötigt, wurden diese aus dem Stickstoff entnommen, zunächst im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in eine geeignete, mit Nährmedium gefüllte Zellkulturflasche pipettiert. Die Verdünnung des DMSO mit Nährmedium sollte schnell erfolgen, da dieses sonst toxisch auf die Zellen wirkte. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Rückstände zu entfernen.

3.1.6 Transfektion von Zelllinien

3.1.6.1 Transiente Transfektion mit siRNA (small interfering RNA)

SiRNAs sind kleine doppelsträngige, 21 Nukleotide lange RNA-Moleküle, die die Expression von Zielgenen verringern. Sie sorgen für den Abbau der mRNA des Zielgens und deaktivieren somit dieses Gen. Die RNA-Interferenz wird verwendet, um einzelne Gene auszuschalten (Elbashir et al., 2001, Siomi und Siomi, 2009). Dazu wird mit Hilfe verschiedener Reagenzien synthetisch hergestellte siRNA in die Zellen eingeschleust (transfiziert). Für die Transfektion der adhärennten Zelllinien wurde das Transmessenger™ Transfektionsreagenz (Qiagen) und für die Suspensionszellen das Nukleofector® Kit (Amaxa) verwendet. Die Überprüfung der Transfektionseffizienz erfolgte anschließend mit einem Western-Blot.

3.1.6.1.1 Transfektion mit Transmessenger™ Transfektionsreagenz

Als erstes erfolgte die Herstellung eines Master-Mix, wie in der Tabelle 3.2 aufgeführt. Dieser Master-Mix wurde auf die einzelnen mit PBS gewaschenen Vertiefungen (Well)

einer Kultivierungsplatte, mit einer Zellkonfluenz von 60-80 %, verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden im Brutschrank erfolgte die Zugabe von serumhaltigem Medium. Um die Transfektionseffizienz zu verbessern, wurde die Transfektion am Folgetag wiederholt.

Tab. 3.2 Master Mix für Transfektion mit Transmessenger™ Transfektionsreagenz

	1 Well	6 Well	10 er dish
1. ECR-Puffer	89 µl	534 µl	538 µl
2. Enhancer	4 µl	24 µl	24,16 µl
3.siRNA/Kontroll-siRNA	7 µl	42 µl	42,28 µl
1.-3. in PS-Röhrchen zusammenpipettieren und 5 Minuten inkubieren			
4. Transmessenger™	8 µl	48 µl	48,32 µl
4. Hinzugeben und 10 Minuten inkubieren			
Medium serumfrei	900 µl	5400 µl	5400 µl

3.1.6.1.2 Transfektion mit Nucleofector® Kit (Amaxa)

Da sich die U937-Zellen nur sehr schwer transfizieren lassen, wurden diese mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Dabei wird die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Impuls permeabilisiert und die siRNA bekommt die Möglichkeit, durch Diffusion in die Zelle zu gelangen. Die Transfektion wurde laut Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.7 Herstellung und Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien

3.1.7.1 Ermittlung der für die Selektion notwendigen Zeocin-Konzentration

Hierzu wurden jeweils 10×10^4 NIH3T3-Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen unterschiedlichen Konzentrationen von Zeocin ausgesetzt und dann bei 37 °C weiterkultiviert. Für die Selektion wurde die Konzentration verwendet, die nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen zum Absterben aller Zellen geführt hatte.

3.1.7.2 Durchführung der Transfektion

Für die Transfektion wurden am Vortag $30-40 \times 10^4$ NIH3T3-Zellen in serumhaltigem DMEM in eine Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Transfektion mit Transfast™ Transfektion Reagenz (Promega). Das totale Volumen des nachfolgenden Ansatzes, der in ein PS-Tube pipettiert wurde, betrug pro Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser 6 ml.

4 µg	Plasmid-DNA
12 µl	1:1 Transfast = 4 x 3
x ml	serumfreies Medium

Es folgte eine Inkubationszeit des Ansatzes von 10-15 Minuten. Die inkubierte Plasmid-DNA-haltige Lösung wurde auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und das Ganze eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Zugabe von 12 ml serumhaltigem Medium. Am Folgetag konnte die Zeocin-Selektion mit der ermittelten Konzentration von 2000 µg/µl gestartet werden. Während der Selektion wurde alle 2-3 Tage das Zeocin-haltige Medium gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nach ca. 4 Wochen konnten einzelne Zellkolonien, die sich auf plasmidtragende Zellen zurückführen ließen, identifiziert werden. Von diesen Zellkolonien wurden einzelne Zellen in eine 96-Well-Platte überführt. Nach ausreichender Vermehrung jedes Zellklons wurde die Expression des transfizierten Gens mit Hilfe eines Western-Blots überprüft.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Um aufgetrennte Proteine in einem Western-Blot analysieren zu können, wurde im ersten Schritt eine Gesamtproteinextraktion durchgeführt. Hierzu wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und diese mit gekühltem PBS überschichtet. Es folgte die Ablösung der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers und die Überführung des Zell-PBS-Gemisches in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup. Nach einer Zentrifugation für 1 Minute bei 1200 rpm wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in eine angemessene Menge Lysepuffer aufgenommen und auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer durch 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm entfernt. Das gewonnene Lysat wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C eingefroren.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration des Zelllysats wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wurde das Bio-Rad Protein Assay Reagenz verwendet, welches 1:5 mit Wasser verdünnt und jeweils 500 µl in eine Einmal-Küvette pipettiert wurde. Zur Erstellung einer Eichgerade wurden 2-12 µg/µl Rinderserumprotein (1:10 BSA/Lysepuffer) in die Einmal-Küvette hinzugegeben. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysats wurde jeweils 1µl des Zelllysats hinzu pipettiert. Die Messung erfolgte mit dem BioPhotometer (Eppendorf).

Durch die Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm (ohne Protein) auf 595 nm (mit Protein). Diese Zunahme der Absorption bei 595 nm kann im Photometer gemessen und so die Proteinkonzentration im Vergleich zur Eichkurve ermittelt werden (Rehm, 2002).

3.2.3 Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Grundsätzlich dient die Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld. Dabei lagert sich SDS an die Proteine an und überdeckt deren Eigenladung. Alle Proteine sind nachfolgend negativ geladen und wandern im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Hierbei wandern kleinere Proteine schneller zur Anode als große Proteine. Die Größe der negativ geladenen Proteine korreliert mit ihrem Molekulargewicht, welches anhand

eines mitlaufenden Markers ermittelt werden kann. Das zur Auftrennung der Proteine verwendete Gel besteht aus einem Trenngel und einem darüber geschichteten Sammelgel. Das Sammelgel sorgt für eine Fokussierung der Proteine, das Trenngel trennt die Proteine anhand ihres Molekulargewichts auf. Die Konzentration an Acrylamid in den Gelen bestimmt deren Trennbereich (Rehm, 2002).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zuerst zwei Glasplatten mit 100 % Ethanol gereinigt, so dass diese absolut fettfrei waren. Anschließend wurden sie durch Spacer voneinander getrennt zusammengesetzt. Das hergestellte Trenngel wurde, wie in Abschnitt 2.3.2.4 beschrieben, mit Ammoniumpersulfat (APS) sowie dem Polymerisierungskatalysator Tetramethylethyendiamin (TEMED) versetzt und zügig zwischen die zwei Glasplatten gegossen. Das Trenngel wurde anschließend mit einer Schicht Ethanol bedeckt. Nach seiner vollständigen Polymerisation wurde die Ethanolschicht abgenommen und das Sammelgel überschichtend hinzu pipettiert. Nach Einbringen des Kamms, der die Taschen für die Proben formen sollte, wurde auf die vollständige Polymerisation des Sammelgels gewartet. Bevor die Proben in die Taschen des Sammelgels eingebracht werden konnten, mussten die Proteine der Probe vollständig aufgelöst, eventuelle Proteasen inaktiviert und Tertiärstrukturen unterbunden werden (Rehm, 2002). Hierzu wurden die Proben in 5 x Lämmli-Probenpuffer 5 Minuten lang im Heizblock auf 95 °C erhitzt und danach kurz auf Eis abgekühlt. Anschließend folgte das Auftragen von jeweils 20 µl jeder Probe, sowie bei jedem Gel jeweils 5 µl Precision Plus Protein™ Standards (BioRad) als Größenstandard und das Anlegen einer elektrischen Spannung. Die Spannung betrug zunächst 85 Volt, wurde aber nach Durchlaufen des Sammelgels auf 140 Volt erhöht. Die Proteine wurden anschließend auf eine PDVF-Membran übertragen.

3.2.4 Western-Blot und immunchemische Detektion

Beim Western-Blot werden aufgetrennte Proteine von der Polyacrylamidmatrix elektrophoretisch auf eine Membran transferiert. Anschließend können die mit Hilfe des Western-Blots immobilisierten Proteine mittels Antikörpern nachgewiesen werden (Immunoblot).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Nass-Transfer auf eine PVDF-Membran in einer Mini-Protean Elektrophoresekammer (BioRad) durchgeführt. Hierzu wurde die Membran in 100 % Methanol aktiviert und anschließend mit dem Gel, wie in Tabelle 3.3 aufgeführt, in eine mit Transferpuffer gefüllte Transferzelle eingebracht. Dabei wurden

das Gel und die Membran sandwichartig durch das Filterpapier eingerahmt, wobei das Filterpapier als Ionenreservoir diente. Es war drauf zu achten, dass die Membran luftblasenfrei dem Gel auflag.

Tab. 3.3 Aufbau eines Western-Blot

Kathode (-)
1 Flies
2 Whatman Papiere
SDS-Gel ohne Sammel- und Stoppgel
aktivierte PVDF-Membran
2 Whatman Papiere
1 Flies
Anode (+)

Der Transfer erfolgte für die Dauer von 105 Minuten bei 400 mA unter ständiger Eiskühlung, wobei die durch SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wanderten und so auf Grund hydrophober Wechselwirkungen auf die Membran transferiert wurden.

Bevor die Membran mit spezifischen Antikörpern behandelt werden konnte, wurden unspezifische Bindungsstellen der Proteine und Membran mit einem Blocker abgesättigt und so unspezifische Antikörper-Bindungen verhindert. Zu diesem Zweck wurde die Membran für 1 Stunde in 5 % Trockenmilch-Blockpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit einem proteinspezifischem, verdünntem Erstantikörper bei 4 °C über Nacht behandelt. Die Verdünnung des Erstantikörpers richtete sich nach den Herstellerangaben, wurde selbst optimiert und erfolgte mit Trockenmilch-Blockpuffer. Um ungebundene Erstantikörper zu entfernen, wurde die Membran am Folgetag dreimal 15 Minuten mit 1 x TBS-T gewaschen und anschließend der mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Zweitantikörper hinzugefügt. Nach drei weiteren Waschgängen mit jeweils 10 Minuten Dauer erfolgte die Entwicklung des Western-Blots, wodurch die Position des Antigens sichtbar gemacht wurde. Die Detektion des Antigens erfolgte mit Hilfe von Enhanced Chemiluminescence Reagenz (ECL). Hierbei katalysierten die peroxidase-markierten Antikörper die Oxidation von Luminol und lösten so eine Chemilumineszenz aus, die unter Verwendung eines Hyperfilm™ ECL

Röntgenfilms (GE Health Care) detektiert werden konnte (Rehm, 2002). Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in einer automatischen Entwicklermaschine (Crurix 60, AGFA). Nach der Detektion der entsprechenden Proteine wurde zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinkonzentration eine β -Aktin-Ladungskontrolle durchgeführt. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung sind in Abschnitt 2.5 aufgelistet.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.2 Methoden im Umgang mit RNA

3.3.2.1 Isolierung von RNA aus Zelllinien

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des RNeasy[®]-Mini Kits (Qiagen).

Zu Beginn wurden die vorbehandelten Zellen mit RLT-Puffer lysiert, wobei Zellreste mit einem sterilen Zellschaber aus der Kulturschale abgelöst wurden, um möglichst viel Lysat zu gewinnen. Es erfolgte eine Homogenisierung der Lösung durch eine QIA-Shredder-Säule (Qiagen). Die weitere Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte gemäß den Angaben von Qiagen. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte die Vermischung von 1 μ l des entstandenen RNA-Eluates mit 99 μ l 10 mM Tris-Puffer (pH 8) in einer UV-durchlässigen Einmalküvette und anschließend die Messung der Konzentration gegen eine Referenzlösung im Spektralphotometer.

Die Konzentrationsbestimmung ist über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm möglich. Die Gesamt-RNA-Konzentration errechnet sich aus der Formel: $c[\text{RNA}] \text{ in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = 40 \times A_{260} \times 100 (\text{Verdünnungsfaktor}) / 1000$.

Eine relative Absorption von 1 ($\text{OD} = 1$) entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei Doppelstrang-DNA bzw. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei Einzelstrang-DNA/RNA. Durch das Verhältnis der OD bei verschiedenen Wellenlängen kann eine Aussage über die Proteinkontamination der verwendeten RNA gemacht werden. Je größer das Verhältnis zueinander, desto geringer die Proteinkontamination (Mülhardt, 2000).

Da für die Durchführung des unten beschriebenen RT Profiler PCR Arrays eine hohe Qualität an RNA benötigt wurde, waren laut Herstellerangaben folgende Verhältnisse gefordert: $\text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} > 2,0$; $\text{OD}_{260} : \text{OD}_{230} > 1,7$

3.3.2.2 cDNA-Synthese

Auf Grund der größeren Instabilität von RNA gegenüber DNA musste die gefällte RNA für die quantitative Real-Time PCR in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (Abb. 3.1). Die First-Strand-Synthese der cDNA erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, nach dem Protokoll und den Reagenzien des Omniscript RT Kits (Qiagen). Dazu wurden 2 µg der isolierten RNA mit RNase-freiem Wasser auf insgesamt 12 µl aufgefüllt und mit folgendem Ansatz vermischt, so dass ein Endvolumen von 20 µl erreicht wurde:

2,0 µl	10 x RT-Puffer
2,0 µl	dNTP-Mix
2,0 µl	10 µM Oligo-(dT)-Primer
1,0 µl	10 Units/µl RNase-Inhibitor
1,0 µl	Omniscript Reverse Transkriptase

Das entstandene Gemisch wurde für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Während dieser Inkubationszeit lagerten sich die Primer an die mRNA an und die Reverse Transkriptase startete die cDNA-Synthese. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.7 dargestellt. Nach Beendigung der cDNA-Synthese erfolgte eine Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 93 °C für 5 Minuten. Die entstandene cDNA wurde als Ausgangsmaterial für die nachfolgende quantitative RT-PCR verwendet.

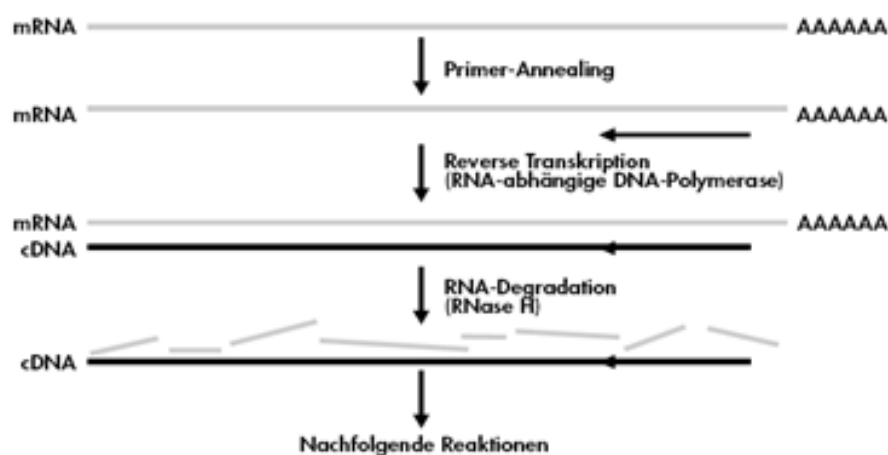


Abb. 3.1 Schema der Herstellung von cDNA.
(Quiagen, 2009)

3.3.2.3 PCR und quantitative Real-time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion oder PCR (engl. „polymerase chainreaction“) ist eine Methode zur in vitro Nukleinsäure-Amplifikation. Dazu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, Ausgangs-DNA und zwei passende Oligonucleotidprimer benötigt. Das Standard-PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Die Denaturierung, das heißt die Trennung der beiden Stränge der Ausgangs-DNA (Template-DNA), erfolgt bei 94 °C. Das anschließende Anlagern der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer (for/rev) an die nun einzelsträngige Template-DNA wird durch eine Senkung der Temperatur auf 55 °C erreicht (Annealing). Nachfolgend wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, so dass die thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) optimale Bedingungen vorfindet, um einen komplementären Zweitstrang zu synthetisieren (Elongation). Am Ende dieses dreiphasigen Zyklus hat sich die Zahl der Template-DNA verdoppelt. Die Anzahl der Zyklen richtet sich nach individuellen Ansprüchen, die Anlagerungstemperatur ist vom GC-Gehalt des Primers abhängig (Mülhardt, 2000).

Tab. 3.4 Schema einer dreiphasigen PCR (40 Zyklen)

	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 sec
Annealing	55 °C	30 sec
Elongation	72 °C	1 min
End-Elongation	72 °C	4 min

Die quantitative Real-Time-PCR bedient sich ebenfalls des oben beschriebenen Prinzips zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, ermöglicht aber zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR[®]Green, welcher in der Lage ist, an Doppelstrang-DNA zu binden. Die Amplifikation der cDNA kann durch eine Zunahme der Fluoreszenz pro Zyklus verfolgt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein SYBR[®]Green PCR Master Mix-Ansatz (AppliedBiosystems) zusammenpipettiert, welcher jeweils mit 1 µl cDNA vermischt und in eine 96-Well-Platte pipettiert wurde.

10 µl	SYBR [®] Green
0,1 µl	10 pM Primer for
0,1 µl	10 pM Primer rev
8,8 µl	H ₂ O

Die Quantifizierung der gewonnenen DNA erfolgte mit Hilfe des 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet, wobei der C_t -Wert (engl. Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Fluoreszenz des Hintergrunds ansteigt. Die C_t -Werte des Ziel- und Referenzgens wurden voneinander abgezogen ($\Delta\Delta C_t$) und die Daten delogarithmiert. (Ziel- und Referenzgen = $2^{-\Delta\Delta C_t}$). Als Referenzgen diente das ribosomale Protein RPLPO (xs13). Die verwendeten Oligonukleotidprimersequenzen sind in Tabelle 2.7 dargestellt.

3.4 Genexpressionsprofilanalyse

Um von Zellen produzierte Zytokine und exprimierte Rezeptoren erfassen zu können, wurde ein Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors PCR Array (SABiosciences Corporation) durchgeführt, welches auf dem Prinzip der quantitativen Real-Time PCR beruht. Dazu wurden die Makrophagen mit mCUTL1_2, laut dem in Tabelle 3.1.6.2 aufgeführten Protokoll, mit TransMessenger[™] Transfektionsreagenz transfiziert. Es folgte die RNA-Isolierung mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kits (Qiagen). Die isolierte RNA wurde mit RNase freiem 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) verdünnt und die Konzentration, wie in Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben, bestimmt. Dabei empfahl der Hersteller des RT Profiler PCR Arrays eine RNA Konzentration und Reinheit von $A_{260}:A_{230}$ von größer als 1,7 und $A_{260}:A_{280}$ größer als 2,0. Nach erfolgter RNA-Isolation wurde die cDNA mit dem RT² First Strand Kit (C-03) (SABiosciences Corporation) hergestellt. Dazu wurden 2 µg RNA als Ausgangsmaterial verwendet. Anschließend wurde diese cDNA mit dem mitgelieferten PCR-Master-Mix (RT² SYBR Green / ROX PCR Master Mix) vermischt, zu gleichen Anteilen in die mit Primern bestückte 96-Well-Platte pipettiert und das RT-PCR-Programm (7500 Fast Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems) gestartet. Die Auswertung der Daten erfolgte durch das vom Hersteller im Internet bereitgestellte Programm (SABiosciences, 2008).

3.5 Stimulationsversuche

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Stimulationsversuche von Zellen mit TGF- β . Dazu wurden am ersten Tag Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät und diese Zellen über Nacht (10 h) bei 0 % FCS ausgehungert. Am Folgetag wurde dieses Medium abgenommen und durch 10 % FCS-haltiges Medium mit 10 ng TGF- β ersetzt. Jeweils nach 8, 24 und 32 Stunden erfolgte die Durchführung eines Western-Blots.

Tab. 3.5 Stimulationsversuche mit TGF- β

1. Arbeitsschritt	a) $1,6 \times 10^5$ Zellen/Well J774.A1-Zellen in 6-Well-Platte aussäen b) 5×10^5 Zellen/Well U937-Zellen in 6-Well-Platte aussäen
2. Arbeitsschritt	Zellen für 10 h bei 0 % FCS aushungern
3. Arbeitsschritt	Start der Inkubation mit 10 ng TGF- β
4. Arbeitsschritt	Western-Blot nach 8 h, 24 h, 32 h

3.6 Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay

Das Migrationsassay, auch nach seinem Erstbeschreiber „Boyden-chamber-Assay“ (Boyden, 1962) genannt, ist dadurch gekennzeichnet, dass Zellen durch eine Filtermembran mit Poren eines definierten Durchmessers wandern (Abb. 3.2). Die Größe der Poren ist hierbei so zu wählen, dass die Zellen im oberen Kompartiment aktiv in das untere Kompartiment migrieren können (Entschladen et al., 2005).

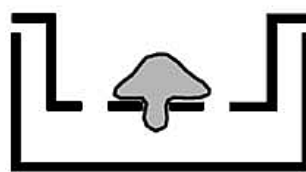


Abb. 3.2 Prinzip eines Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay.
(Entschladen et al., 2005)

Am ersten Tag wurden Zellen ausgesät und anschließend die Transfektion, wie in Abschnitt 3.1.6 beschrieben, durchgeführt. Die so vorbehandelten Zellen wurden mit einer definierten Zellzahl in 750 μ l Medium aufgenommen und in eine spezielle 24-Well-Platte (Multiwell™ Primaria™) überführt (Abb. 3.3 A). Der Serumgehalt des Mediums betrug 1 %. So sollten die Zellen zur Chemotaxis animiert, aber in ihrer Vitalität nicht beeinträchtigt werden. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden

Inserts mit einer Porengröße von 8 μm in die Wells eingesetzt und Zellen, in 250 μl Medium mit 1 % FCS, hinein pipettiert (Abb. 3.3 B).



Abb. 3.3 Schemazeichnung des Versuchsaufbaus eines Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay.

Diese Zellen hatten nun 6-8 Stunden Zeit, um durch die Poren aktiv hindurch zu wandern. Nach Ablauf dieser Wartezeit erfolgte die Auswertung mit dem CellTiter-Glo[®] Reagenz.

Für die Auswertung mit CellTiter-Glo[®] Reagenz war es notwendig, die Inserts mit einem flusenfreien Tuch auszuwischen und mit der Insert-Unterseite für 15 Minuten in 150 μl CellTiter-Glo[®] Reagenz zu hängen. Das Reagenz bestimmte den ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen, die durch die Poren der Inserts hindurch gewandert waren. Der ATP-Gehalt wurde quantitativ mit Hilfe des Luminometers bestimmt. Anschließend wurde die Zahl der migrierten Zellen auf die gleichzeitig bestimmten proliferierenden Zellen normalisiert (Migration/Proliferation).

Tab. 3.6 Schema eines Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay

1. Arbeitsschritt	Adhärente Zellen für Transfektion aussäen: NIH3T3: $4,5 \times 10^3$ Zellen in 6-Well-Platte RLT-PS: $1,2 \times 10^4$ Zellen in 6-Well-Platte J774.A1: $1,2 \times 10^6$ Zellen in 10er dish
2. Arbeitsschritt	Transfektion der im 1. Arbeitsschritt ausgesäten Zellen sowie der Suspensionzellen U937

3. Arbeitsschritt	Vorbehandelte und Panc1-Zellen in Multiwell-Platte pipettieren NIH3T3: $2,5 \times 10^4$ Zellen in 750 μ l DMEM + 1 % FCS RLT-PS: 4×10^4 Zellen in 750 μ l DMEM + 1 % FCS J774.A1: 7×10^4 Zellen in 750 μ l DMEM + 1 % FCS U937: 10×10^4 Zellen in 750 μ l RPMI + 1 % FCS Panc1: 7×10^4 Zellen in 750 μ l DMEM + 1 % FCS
4. Arbeitsschritt	a) Suit007- bzw. Panc1-Zellen in Insert aussäen: 5×10^4 Zellen in 250 μ l DMEM bzw. RPMI + 1 % FCS b) Proliferationskontrolle 5×10^4 Zellen in 1 ml DMEM bzw. RPMI + 1 % FCS in Multiwell-Platte pipettieren 6-8 h Inkubationszeit
5. Arbeitsschritt	Auswertung mit CellTiter-Glo [®] Reagenz

3.7 Proliferationsanalysen

Zur Bestimmung des Zellwachstums kamen zwei unterschiedliche Techniken zum Einsatz.

3.7.1 BrdU-Assay

Das BrdU-Assay misst das Ausmaß der DNA-Synthese der Zellen als direkten Ausdruck deren proliferativen Aktivität. Es beruht auf dem Einbau markierter Nukleotide in die neu synthetisierte DNA. Dies wird durch nachgeschaltete Reaktionen quantifizierbar gemacht. Entstehende Farbstoffe und deren Absorption sind nach Abzug des Leerwertes proportional zur Zahl der proliferierenden Zellen.

Hierzu wurden am 1. Tag J774.A1-Zellen ($1,4 \times 10^5$ Zellen/Well) in eine 6-Well-Platte ausgesät. Am Tag darauf folgte die erstmalige Transfektion der Zellen mit mCUTL1_2 mit TransMessenger[™]. 4 Stunden nach der 2. Transfektion wurden die Zellen mit 10 % FCS bedeckt und weitere 2 Stunden später dieses Medium durch Medium mit verschiedenen Konzentrationen von 1 %, 5 %, 10 % FCS ersetzt. Am 4. Tag wurde das Medium abgenommen und bei 4 °C gelagert.

Das weitere Vorgehen gestaltete sich wie folgt: Es wurden Panc1-Zellen jeweils 5×10^3 in 96-Well-Platte ausgesät. Diese wurden dann mit 0 % FCS-Medium für 12 Stunden „ausgehungert“. Am Tag darauf folgte eine 48-stündige Inkubation mit dem, wie oben

beschrieben, gewonnenen Medium und anschließend die Auswertung mit dem BrdU-Assay (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche).

Pro Well wurden 10 µl einer Lösung mit brommarkiertem Desoxyuridin (5-Bromo-2'-desoxyuridin) zugegeben, was zu einer BrdU-Endkonzentration von 10 µmol/l führte. In der folgenden Reinkubationszeit von 120 Minuten vollzog sich der Einbau des Pyrimidinanalogons BrdU in die DNA proliferierender Zellen anstelle von Thymidin. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt. Nach der Denaturierung der Zellen durch ein mitgeliefertes Schnellfixans erfolgte die Zugabe von hochspezifischen BrdU-Antikörpern in 100 µl Lösung. Nach weiteren 90 Minuten wurden drei Waschgänge durchgeführt und durch Zugabe einer mitgelieferten Substratlösung eine Reaktion zur Detektion der Immunkomplexe ausgelöst. Diese Reaktion wurde nach 30 Minuten mit 25 µl H₂SO₄ (1 mol/l) gestoppt und unmittelbar anschließend die Absorption in einem Multiwell-Spektrophotometer bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

Tab. 3.8 Schema eines BrdU-Assay

1. Arbeitsschritt	J774.A1-Zellen in 6-Well-Platte aussäen: $1,4 \times 10^5$ Zellen/Well
2. Arbeitsschritt	a) 1. Transfektion mit mCUTL 1_2 (TransMessenger TM)
3. Arbeitsschritt	a) 2. Transfektion mit mCUTL 1_2 (TransMessenger TM) b) nach 4 h für 2 h Inkubation mit DMEM + 10 % FCS c) anschließend Inkubation mit 1 %, 5 %, 10 % FCS-haltigem Medium für 48 h
4. Arbeitsschritt	Abnehmen des Mediums (= konditioniertes Medium mit unterschiedlicher FCS-Konzentration) und dessen Lagerung bei 4 °C
5. Arbeitsschritt	a) Panc1-Zellen in 96-Well-Platte aussäen: 5×10^3 Zellen/Well b) nach 6 h mit 0 % FCS versehen und für eine Nacht aushungern
6. Arbeitsschritt	konditioniertes Medium der J774.A1-Zellen auf Panc1-Zellen geben und Inkubation für 48 h
7. Arbeitsschritt	Auswertung mit dem BrdU-Assay

3.7.1 Proliferationsanalyse mit dem CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay

Als zweite Methode zur Messung der Proliferationsaktivität von Zellen wurde das CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay verwendet. Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen mit 100 µl des CellTiter-Glo[®] Reagenz überdeckt und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des ATP-Gehalts der metabolisch aktiven Zellen mit Hilfe des Luminometers.

Tab. 3.9 Schema eines CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay

1. Arbeitsschritt	Aussäen von 5×10^4 CD34 ⁺ -NIH3T3-Zellen pro Vertiefung in eine 6-Well-Platte
2. Arbeitsschritt	a) Aushungern der Zellen bei 0 % FCS für 12 h b) Inkubation der Zellen mit 5 %, 10 % FCS
3. Arbeitsschritt	Abnehmen des Medium nach 24 h und 48 h Inkubation und Lagerung des entstandenen konditionierten Mediums bei 4 °C
4. Arbeitsschritt	a) Suit007-Zellen in 96-Well-Platte aussäen: 4×10^3 Zellen/Well b) nach 6 h mit 0 % FCS versehen und für eine Nacht aushungern
5. Arbeitsschritt	Konditioniertes Medium der CD34 ⁺ -NIH3T3-Zellen auf Suit007-Zellen pipettieren – Inkubation für 48 h
6. Arbeitsschritt	Auswertung mit CellTiter-Glo [®] Reagenz

3.8 Immunfluoreszenz

Bei diesem Verfahren bindet in einem ersten Schritt ein antigenspezifischer Antikörper an Epitope des gesuchten Proteins. In einem zweiten Inkubationsschritt werden diese antigenspezifischen Antikörper mit einem Fluoreszein-markierten sekundären Antikörper detektiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (Abb. 3.4).

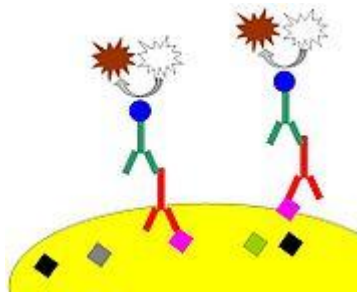


Abb. 3.4 Prinzip der Immunfluoreszenz.

Prinzip: Antigen (rosa) + Primärantikörper (rot) + Sekundärantikörper (grün) mit Chromogen (blau) = Farbe (Wikipedia, 2009).

In einem ersten Schritt erfolgte die Kultivierung stabil transfizierter CD34⁺-Zellen auf einem 13 mm Deckgläschen. Waren die Zellen zu 70-80 % konfluent, wurden die Deckgläschen aus dem Medium genommen und vor der Fixierung der Zellen kurz mit PBS gewaschen. Das PBS enthielt 2 mM MgCl₂, um den Kern der Zellen zu erhalten. Daraufhin wurde den Zellen bei einer Temperatur von -20 °C und einer Inkubationszeit von 5 Minuten in 100 % Methanol und 1 Minute in 100 % Ethanol das intrazelluläre Wasser entzogen. Bevor die Zellen mit dem Primärantikörper für die Färbung inkubiert werden konnten, mussten die Zellmembranen permeabel gemacht werden, was mit Hilfe von 0,1 % Triton-X-100 PBS erreicht wurde, welches auf die Deckgläschen getropft wurde. Es folgte eine Inkubationszeit von 45 Minuten bei 37 °C in der Feuchtkammer mit dem Primär-Antikörper QBend 10 (Abcam), 1:40 in 2 % BSA/PBS verdünnt. Nach dem folgenden dreimaligen Waschen für 15 Minuten mit PBS wurden die Zellen mit dem Zweitantikörper inkubiert. Dazu wurde der mit Cy2 (Fab)-konjugierte Sekundär-Antikörper 1:400 mit PBS verdünnt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss auf die Deckgläschen gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 15 Minuten konnten die Deckgläschen mit Fluoromount G feucht eingedeckt werden. Die Einbettung sicherte die Zellen mechanisch, schützte den Fluoreszenzfarbstoff und erhöhte den optischen Kontrast. Die Detektion des nun markierten Epitops erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops (ApoTome, Zeiss).

3.9 Statistik

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Experimente sind, wenn nicht vermerkt, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (Mittelwert \pm SEM) angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte, wenn nicht vermerkt, auf Grund der nicht normalverteilten Werte und der kleinen Stichproben ($n = 3-6$) mit dem Mann-Whitney-U-Test. Hierbei wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen (Leon Avery, 2010).

Die statistische Auswertung der Genexpressionsanalyse erfolgte mit der vom Hersteller bereitgestellten Software, welche den t-Test verwendete. Auch hier wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ angenommen (SABiosciences, 2008).

4. Ergebnisse

4.1 Effekte der Kokultur von Pankreaskarzinomzellen mit Stromazellen auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen

Die Interaktion der Mikroumgebung eines Pankreaskarzinoms mit den Tumorzellen ist ein wichtiger Faktor für die Progression des Tumors. Um zu verifizieren, ob Zellen des Stromas in vitro einen Effekt auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen haben, wurden Kokultorexperimente mit Hilfe des Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay durchgeführt.

Hierzu wurden RLT-PS- und NIH3T3-Zellen sowie Panc1-Zellen in eine 24-Well-Platte ausgesät und nach deren Kultivierung für 24 Stunden Panc1-Zellen in zuvor darüber eingesetzte Inserts ausgesät (Abb. 4.1 A). Nach weiteren 8 Stunden erfolgte die Messung der Migration der Pankreaskarzinomzellen in den Inserts in Richtung der Zellen auf dem Plattenboden durch die 8 µm großen Poren der Inserts. Als Kontrolle diente eine Platte, auf deren Boden keine Zellen ausgesät waren, die Inserts jedoch mit Panc1-Zellen kultiviert waren. Die Zahl der migrierenden Zellen wurde auf die Anzahl der proliferierenden Zellen in dem betrachteten Zeitraum normalisiert (Migration/Proliferation), um gegebenenfalls proliferationsbedingte Artefakte auszuschließen.

Es zeigte sich, dass durch Zellen, die im unteren Kompartiment eines Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay ausgesät wurden, die Migrationsrate der Pankreaskarzinomzellen signifikant ($p < 0,05$) ansteigt. Hierbei stimulierten Pankreaskarzinomzellen im unteren Kompartiment die Migration der Pankreaszellen im oberen Kompartiment am meisten, aber auch die mesenchymalen Stromazellen sorgten für eine verstärkte Migrationsrate (Abb. 4.1 B).

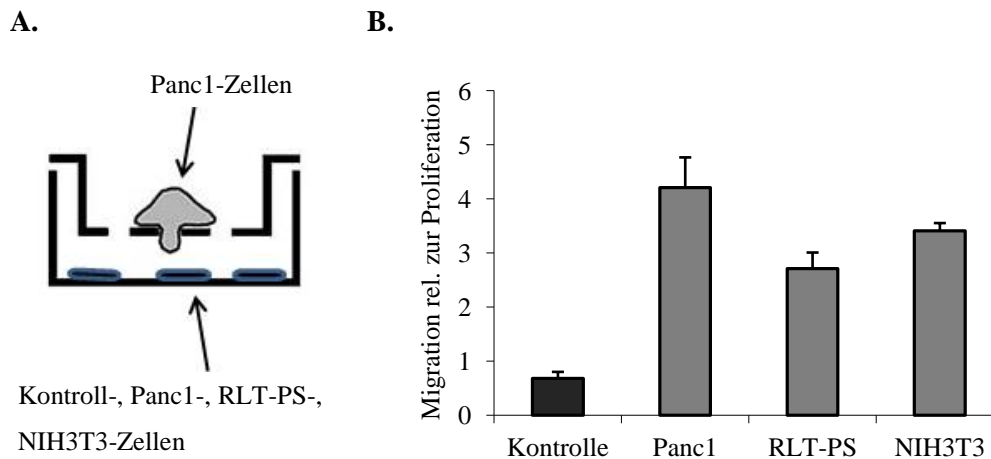


Abb. 4.1 Mesenchymale Stromazellen und Panc1-Zellen im unteren Kompartiment eines Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay führen zu einer erhöhten Migration von Pankreaskarzinomzellen.

(A) Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay mit Panc1-, RLT-PS-, NIH3T3-Zellen im unteren Kompartiment und Panc1-Zellen in den Inserts. (B) Die Messung der Migration der Panc1-Zellen in den Inserts erfolgte nach 8 h Inkubation. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo[®] Reagenz bestimmt und auf die Anzahl der proliferierenden Zellen normalisiert (Migration/Proliferation). Statistik: Die Auswertung erfolgte mittels t-Test: Kontrolle/Panc1-Zellen $p = 0,004$, Kontrolle/RLT-PS-Zellen $p = 0,003$, Kontrolle/NIH3T3-Zellen $p = 0,0001$. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zusammenfassend konnte aus den Boyden-Kammer-Chemotaxis-Versuchen geschlossen werden, dass sezernierte Überstände von Stromazellen, wie RLT-PS- und NIH3T3-Zellen und auch Pankreaskarzinomzellen selbst das Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen positiv beeinflussen. Diese Erkenntnis bildete die Grundlage für die folgenden Experimente.

4.2 Versuchsreihe mit CD34

Als erstes Zielgen stand CD34 im Fokus dieser Arbeit. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Barth (Institut für Pathologie der Universität Marburg) wurde immunhistochemisch eine vermehrte Anzahl von CD34⁺-Fibrozyten im direkten Umfeld des Pankreaskarzinoms nachgewiesen (Barth et al., 2002). Um zu untersuchen, ob diese vermehrte Anzahl im an das Pankreaskarzinom grenzende Parenchym einen positiven oder negativen Effekt auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen hat, wurde eine Analyse des Migrationsverhaltens der Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von CD34-exprimierenden Fibrozyten durchgeführt.

4.2.1 Vorbemerkungen

Zur Überprüfung der Funktionalität des von der Arbeitsgruppe Barth erhaltenen CD34-Plasmids und um dessen Lokalisation in der Zelle zu bestimmen, erfolgte die Erstellung von Immunfluoreszenzbildern mit dem für CD34 spezifischen QBend10-Antikörper. Zunächst erfolgte die transiente Transfektion von NIH3T3-Zellen mit CD34. Die 24 Stunden nach der transienten Transfektion angefertigten Immunfluoreszenzbilder (Abb. 4.2) zeigten ein perinukleäres und in geringerem Maße membranöses Expressionsmuster von CD34.

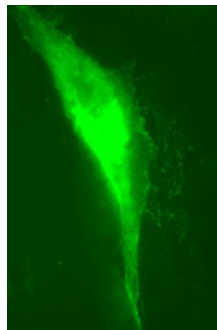


Abb. 4.2 Fibroblasten zeigen 24 h nach transients Transfektion eine hohe Expression von CD34.

Das CD34 wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dargestellt ist eine repräsentative CD34⁺-NIH3T3-Zelle.

4.2.2 Stabile Transfektion des CD34 tragenden Plasmids in NIH3T3-Zellen

Das Ziel der stabilen Transfektion der NIH3T3-Zellen war die Isolierung und Vermehrung von Klonen, die das transfizierte Plasmid in das zelluläre Genom aufgenommen haben. Hierbei diente das verwendete pcDNA4/TO-Plasmid als Vektor für CD34. Als Kontrolle wurden die NIH3T3-Zellen mit dem pcDNA4/TO-Plasmid ohne CD34 transfiziert. Zur Überprüfung der CD34-Expression der stabil transfizierten Zellen wurden Western-Blot-Analysen (Abb. 4.3) durchgeführt.

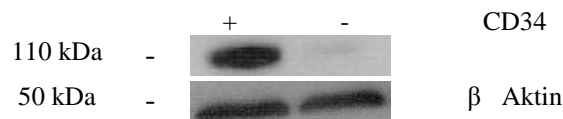


Abb. 4.3 Die stabile Transfektion von Fibroblasten mit CD34 bewirkt eine Erhöhung der Gesamtproteinmenge von CD34.

Durchführung eines Western-Blot von Gesamtproteinextrakten aus NIH3T3-Zellen. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde anschließend ein Western-Blot mit einem Antikörper gegen β -Aktin durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot für die im Rahmen der Selektion durchgeführten Expressionskontrollen.

Durch die Western-Blot-Analysen konnte eine Erhöhung der Gesamtproteinmenge von CD34 nach stabiler Transfektion der NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden, woraufhin diese Klone für die folgende Experimente verwendet wurden. Die Verwendung von stabilen Klonen birgt prinzipiell das Problem, dass die stabile Transfektion zu nicht vorhersehbaren klonalen Effekten durch die zufällige Integration des Plasmids in das Wirtsgenom führen kann. Zu diesen sekundären Effekten können zum Beispiel das Ausschalten oder die Aktivierung anderer Gene in Abhängigkeit des Integrationslokus gehören. Aus diesem Grund wurden jeweils zwei CD34-positive und zwei CD34-negative Klone parallel zueinander untersucht.

4.2.3 CD34-vermittelte Effekte auf die Migration und Proliferation der Pankreaskarzinomzellen

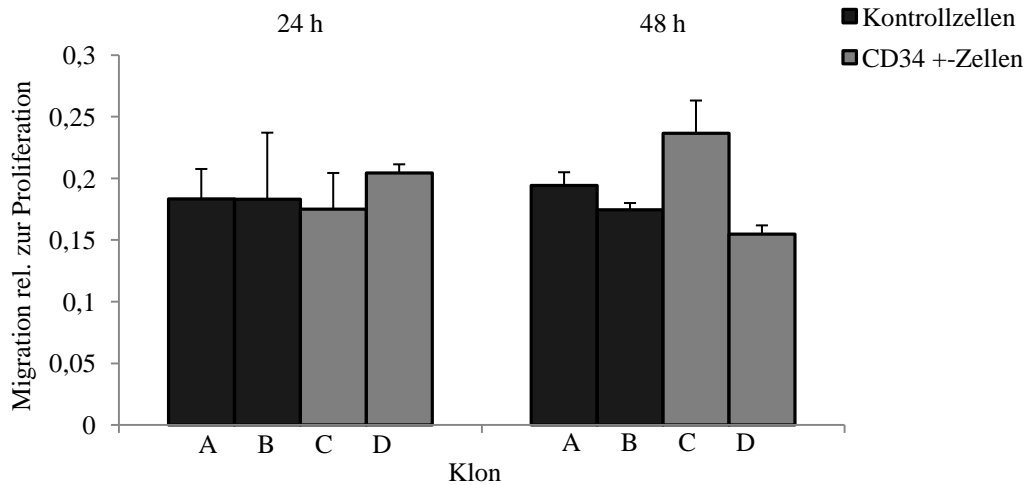
Nach Herstellung der stabilen CD34-exprimierenden NIH3T3-Zellen sollte evaluiert werden, ob die CD34-positiven Fibroblasten parakrin wirksame Signalmoleküle, z.B. Wachstumsfaktoren oder Zytokine, im Vergleich zu den CD34-negativen Fibroblasten produzieren, die die Proliferation und Migration der Pankreaskarzinomzellen beeinflussen können, beziehungsweise, ob CD34 die Funktion von tumorassoziierten Fibroblasten verändert.

4.2.3.1 Die Überexpression von CD34 in Fibroblasten hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen

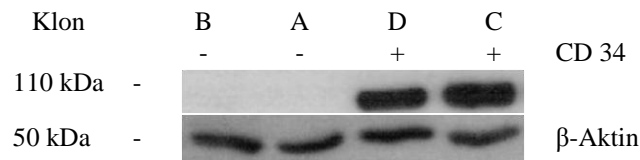
Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens der Pankreaskarzinomzellen unter dem Einfluss von CD34 wurden erneut Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assays durchgeführt. Als Pankreaskarzinomzelllinie wurde Suit007-Zellen verwendet, um deren Migration gegebenenfalls mit der von Suit028-Zellen vergleichen zu können, welche dafür bekannt sind, eine geringere Migrationsbereitschaft zu haben.

Für die Experimente wurden die stabil transfizierten Fibroblasten in einer speziellen 24-Well-Platte inkubiert, in die nach 24 bzw. 48 Stunden Inserts eingesetzt und im Anschluss daran Pankreaskarzinomzellen in diese Inserts ausgesät wurden. Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden erfolgte die Auswertung. Hierbei konnte kein Einfluss auf das Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen durch die vermehrte Expression von CD34 in den Fibroblasten festgestellt werden (Abb. 4.4 A). Die Kontrolle der CD34-Expression der NIH3T3-Zellen erfolgte durch Western-Blot-Analysen (Abb. 4.4 B und C).

A.



B. Kontrolle der CD34-Expression der NIH3T3-Zellen nach 24 h Inkubation



C. Kontrolle der CD34-Expression der NIH3T3-Zellen nach 48 h Inkubation

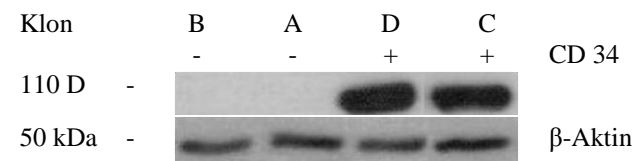


Abb. 4.4 Kein verändertes Migrationsverhalten der Suit007-Zellen durch CD34⁺-Fibroblasten.

(A) Die Migration der Suit007-Zellen in den Inserts wurde nach 8 h Inkubation quantifiziert. Die Anzahl migrierender Zellen wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo[®] Reagenz bestimmt und auf die Anzahl proliferierender Zellen normalisiert (Migration/Proliferation). Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B), (C) Die CD34-Expression wurde jeweils nach 24 bzw. 48 h mittels Western-Blot analysiert.

Zusammengefasst zeigten sich bei diesen Experimenten zwar klonale Unterschiede, jedoch keine signifikanten Unterschiede im Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen unter dem Einfluss von CD34-positiven und CD34-negativen Klonen.

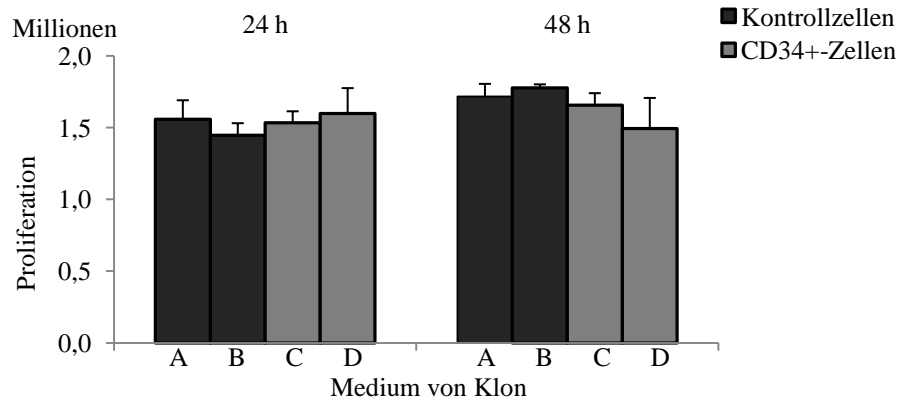
4.2.3.2 Die Überexpression von CD34 in Fibroblasten hat keinen eindeutigen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen

Um zu überprüfen, ob CD34⁺-Fibroblasten Mediatoren produzieren, die das Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen (Suit007-Zellen) beeinflussen, wurden Viabilitätsassays durchgeführt.

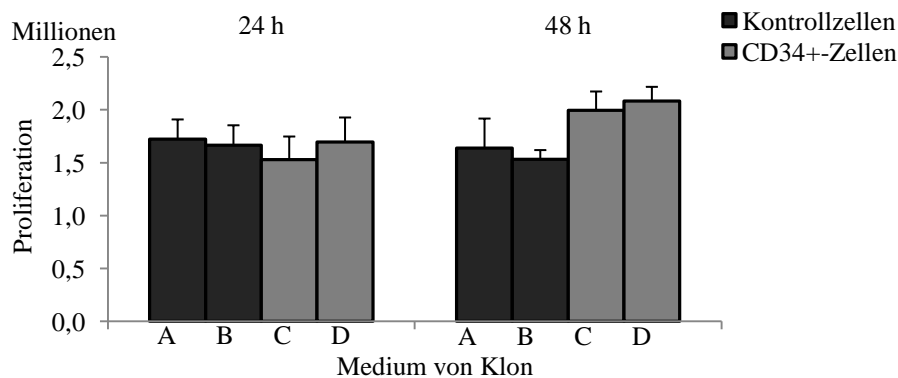
Dazu wurde konditioniertes Medium von stabil mit CD34 oder mit dem Leervektor transfizierten NIH3T3-Zellen verwendet, das nach 24 und 48 Stunden von den Zellen abgenommen wurde. Es folgte die 48-stündige Inkubation der Suit007-Zellen mit diesem Medium und anschließende Messung der Proliferation der Pankreaskarzinomzellen mit Hilfe des CellTiter-Glo[®] Reagenz. Ziel war der Vergleich der Proliferation der Pankreaskarzinomzellen bei Inkubation mit von CD34-positiven Fibroblasten gewonnenem Medium einerseits und dem Medium von CD34-negativen Klonen andererseits.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Ko-Inkubation der Suit007-Zellen für 24 Stunden mit konditioniertem Medium der CD34⁺-Fibroblasten unter zwei definierten Serumkonzentrationen im Medium keinen Einfluss auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen hat. Erfolgte eine Inkubation über 48 Stunden mit 5 % FCS haltigem, konditioniertem Medium, konnte wiederum kein Unterschied in der Proliferation der Suit007-Zellen festgestellt werden (Abb. 4.5 A und B). Im Gegensatz dazu konnte bei der Inkubation mit konditioniertem Medium über den gleichen Zeitraum mit einer Serumkonzentration von 10 % FCS eine Zunahme der Proliferation bei Überexpression von CD34 der Fibroblasten im Vergleich zum konditionierten Medium der Referenzklone (CD34-negativ) beobachtet werden (Abb. 4.5 B). Dieser Unterschied in der Proliferation erreichte jedoch keine Signifikanz ($p > 0,05$).

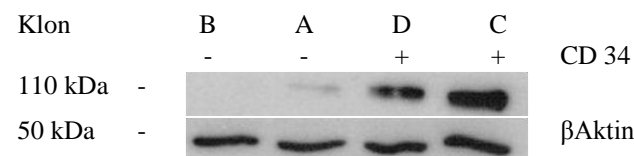
A. Medium mit 5 % FCS



B. Medium mit 10 % FCS



C. Kontrolle der CD34-Expression der NIH3T3-Zellen nach 24 h Inkubation



D. Kontrolle der CD34-Expression der NIH3T3-Zellen nach 48 h Inkubation

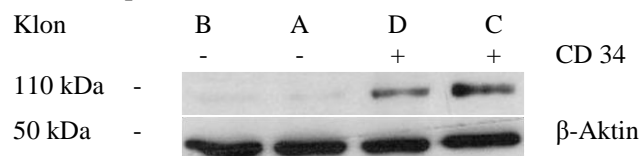


Abb. 4.5 Inkubation von Suit007-Zellen mit Medium von CD34⁺-Fibroblasten hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Moderate, nicht signifikante, Zunahme der Proliferation bei 48 h Inkubation mit 10% FCS-haltigem konditioniertem Medium.

(A) konditioniertes Medium mit 5 % FCS, (B) konditioniertes Medium mit 10 % FCS. Gewinnung des konditionierten Mediums der Fibroblasten nach 24 bzw. 48 h. Untersuchung der Proliferation der Pankreaskarzinomzellen nach 48 h Inkubation im konditionierten Medium mit CellTiter-Glo[®] Reagenz. Statistik: Medium mit 10 % FCS für 48 h $p = 0,1$ bis $0,4$ bei Vergleich der einzelnen Klone untereinander (Klon A mit Klon C, D und Klon B mit Klon C,D). (C), (D) Western-Blot-Analyse der CD34-Expression der Fibroblasten nach Abnahme des konditionierten Mediums. Als Ladungskontrolle diente β -Aktin. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Wie schon bei den Experimenten zu Effekten von CD34 auf die Zellmigration, konnte bei der Untersuchung des Proliferationsverhaltens unter dem Einfluss von CD34, abgesehen von den klonalen Unterschieden, kein eindeutiger Zusammenhang zwischen CD34 und der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen festgestellt werden. Lediglich bei längerer, 48-stündiger Inkubation der Pankreaskarzinomzellen mit konditioniertem Medium mit 10% FCS der CD34⁺-Fibroblasten konnte eine moderate, nicht signifikante Zunahme der Proliferation beobachtet werden, welche sich in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten reproduzieren ließ.

4.3 Versuchsreihe mit CUX1

Das zweite Zielgen dieser Arbeit war der Transkriptionsfaktor CUX1, von welchem die Arbeitsgruppe deutliche Effekte auf die Zellmotilität, Migration und Invasion verschiedener Tumorzelllinien beschrieben hat (Michl et al., 2006b, Michl et al., 2005).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Expression von CUX1 in mesenchymalen Zellen und Makrophagen, die wichtige Zellen des Tumorstromas sind, untersucht. Durch die Western-Blot-Analysen (Abb. 4.6) konnte gezeigt werden, dass CUX1 in diesen Zelllinien zusätzlich zur starken Expression in Tumorzellen ebenfalls hoch exprimiert wird.

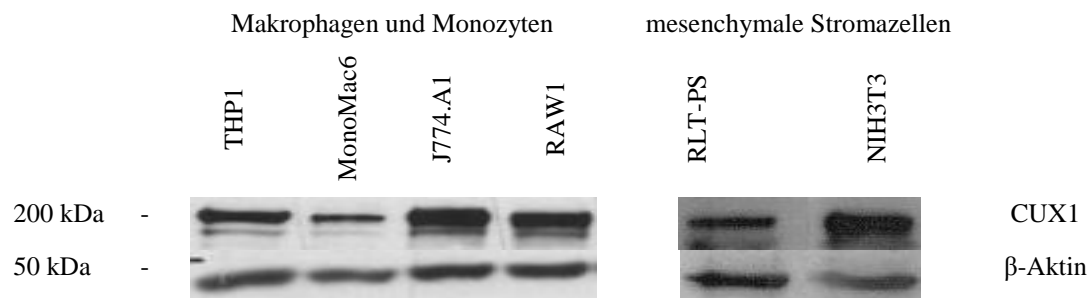


Abb. 4.6 CUX1-Expression in Makrophagen bzw. Monozyten und mesenchymalen Stromazellen.

Auf Proteinebene erfolgte der qualitative Nachweis einer Expression von CUX1 in Makrophagen (J774.A1-, RAW1-Zellen), Monozyten (MonoMac6-, THP1-Zellen) und mesenchymalen Stromazellen (NIH3T3-, RLT-PS-Zellen) mittels Western-Blot-Analysen.

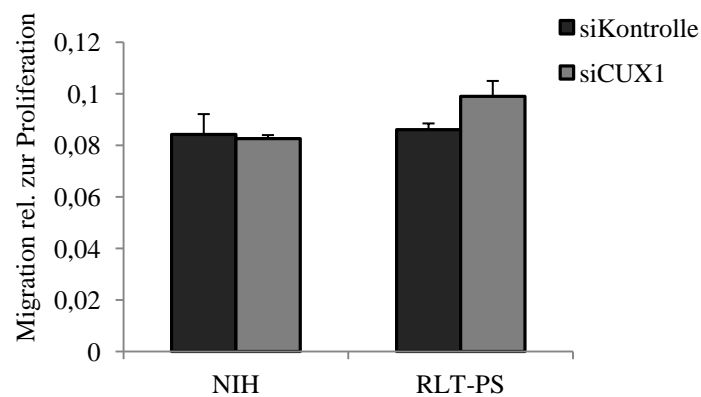
4.3.1 CUX1 in mesenchymalen Stromazellen

4.3.1.1 Die Repression von CUX1 in mesenchymalen Stromazellen hat keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen

Aufgrund der hohen Expressionslevel sollte im Rahmen dieser Arbeit der Effekt der transienten Repression von CUX1 in mesenchymalen Stromazellen und Makrophagen in Hinsicht auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen (Panc1-Zellen) untersucht werden.

Dazu wurde CUX1 in NIH3T3- und RLT-PS-Zellen transient mit siRNA reprimiert und die Zellen in einer speziellen 24-Well-Platte über Nacht kultiviert. Die Panc1-Zellen, die am Folgetag in die Inserts ausgesät wurden, hatten anschließend 8 Stunden Zeit, entlang eines chemotaktischen Gradienten durch die 8 μm großen Poren, der oberhalb der einzelnen Vertiefung eingesetzten Inserts, zu migrieren. Wie in Abbildung 4.7 A dargestellt, konnte kein Unterschied im Migrationsverhalten der Panc1-Zellen, die entweder Kontakt zum Medium der CUX1 reprimierten Stromazellen oder der Kontrollzellen hatten, festgestellt werden.

A.



B.

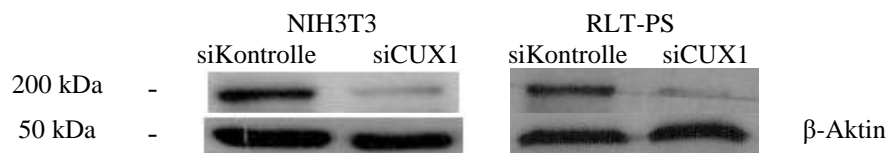


Abb. 4.7 Kein verändertes Migrationsverhalten der Panc1-Zellen bei Repression von CUX1 in mesenchymalen Stromazellen.

(A) Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay mit NIH3T3- und RLT-PS-Zellen im unteren Kompartiment. Panc1-Zellen in den Inserts. Die Anzahl der migrierten Panc1-Zellen wurde nach 8 h mit Hilfe des CellTiter-Glo® Reagenz bestimmt und auf die Anzahl der proliferierenden Zellen normalisiert (Migration/Proliferation). (B) Die Repression von CUX1 in den zwei verschiedenen fibroblastischen Zelllinien wurde mittels Western-Blot analysiert. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zusammenfassend konnte bei den durchgeführten Versuchen der CUX1 Modulation in mesenchymalen Stromazellen kein Zusammenhang zwischen CUX1-Repression und verändertem Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen hergestellt werden.

4.3.2 CUX1 in Makrophagen

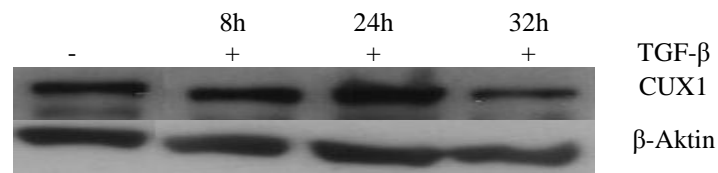
Da die Modulation von CUX1 in mesenchymalen Stromazellen keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen hatte, sollten als zweiter wichtiger Zelltyp des Tumorstromas die Entzündungszellen in Hinblick auf die CUX1-Expression und Funktion untersucht werden. Als der am häufigsten auftretenden Subtyp der Entzündungszellen standen Makrophagen im Fokus der folgenden Experimente.

4.3.2.1 Zeitabhängige Veränderung der CUX1-Expression der Makrophagen durch TGF- β

Die im Tumorstroma ansässigen Makrophagen unterdrücken die gegen den Tumor entstehende Immunreaktion durch die Sekretion von antiinflammatorisch wirksamen Zytokinen, z. B. TGF- β (Sica et al., 2008a). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde CUX1 als nachgeschalteter (downstream) Transkriptionsfaktor des TGF- β -Signalwegs beschrieben (Michl et al., 2005). Zur Darstellung der CUX1-Expression in Makrophagen und der möglichen Modulation durch TGF- β wurden Western-Blot-Analysen unter Verwendung eines CUX1 Antikörpers durchgeführt.

CUX1 wurde, wie in Abb. 4.8 gezeigt, in hohem Maße von den U937- und J774.A1-Makrophagen exprimiert. Die zusätzliche Stimulation dieser Zellen mit TGF- β bewirkte eine zeitabhängige Veränderung dieser Expression. Durch die Stimulation der U937- und J774.A1- Zellen mit 10 ng/ml TGF- β nahm die Expression von CUX1 nach acht Stunden Inkubationszeit gering zu. Ein maximaler Anstieg der CUX1-Expression konnte nach 24 Stunden gezeigt werden, nach 32 Stunden hingegen zeigte sich wieder ein Abfall der CUX1-Expression.

A.



B.

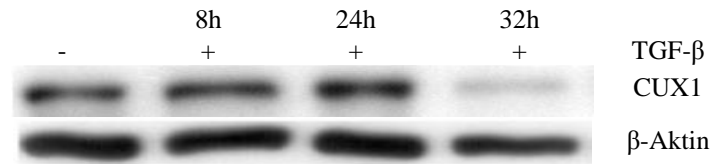


Abb. 4.8 Zeitabhängige Veränderung der CUX1-Expression in U937- und J774.A1-Zellen durch TGF- β .

(A) U937-Zellen, (B) J774.A1-Zellen. Nach 8, 24 bzw. 32 h Inkubation erfolgte Western-Blot-Analysen der Gesamtproteinextrakte der U937- und J774.A1-Zellen in Bezug auf die TGF- β abhängige CUX1-Expression. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Versuch für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Insgesamt konnte ein regulatorischer Effekt von TGF- β auf die CUX1-Expression in beiden untersuchten Zelllinien beobachtet werden, welcher nach 24 Stunden zu einer maximalen Zunahme führte.

4.3.2.2 Die Repression von CUX1 in Makrophagen und deren Auswirkung auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen

Auf funktioneller Ebene sollten die Makrophagen hinsichtlich promigratorischer und proliferativer CUX1 Effekte auf die im Tumorstroma benachbarten Pankreaskarzinomzellen untersucht werden. Hierzu erfolgte die Durchführung von Migrations- und Proliferationsanalysen der Pankreaskarzinomzellen unter Einfluss der Modulation der CUX1-Expression in den Makrophagen und der damit verbundenen unterschiedlichen Expression und Ausschüttung von Botenstoffen.

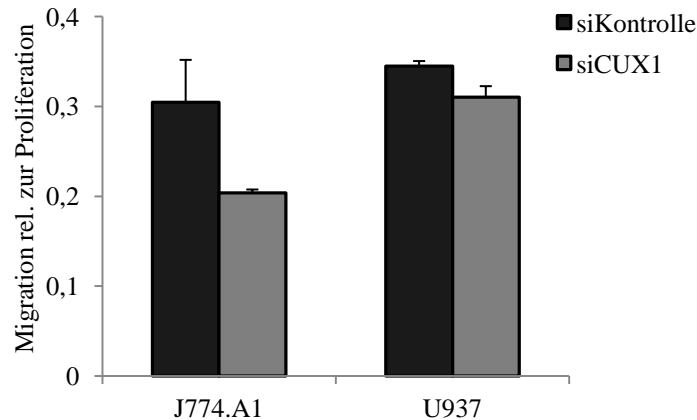
4.3.2.2.1 Abnahme der Migration von Pankreaskarzinomzellen bei Repression von CUX1 in J774.A1-Makrophagen

Der durchgeführte Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay (Abb. 4.9 A) zeigte, dass die transiente Repression von CUX1 in J774.A1-Makrophagen eine reproduzierbare Abnahme der Migration der Pankreaskarzinomzellen von 38,9 % zur Folge hatte. Diese Tendenz konnte in vier konsekutiv und unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Im Mittel der vier Versuche betrug die Abnahme der Migration 26,5 % im Gegensatz zur Kontrolle. Allerdings erreichte diese

Reduktion innerhalb eines Assay bei dreifacher Bestimmung der einzelnen Werte keine Signifikanz.

Im Gegensatz dazu konnte bei den U937-Makrophagen kein Effekt auf die Migration der Pankreaszellen beobachtet werden, wenn sie Kontakt zum Medium der CUX1 negativen Makrophagen hatten.

A.



B.

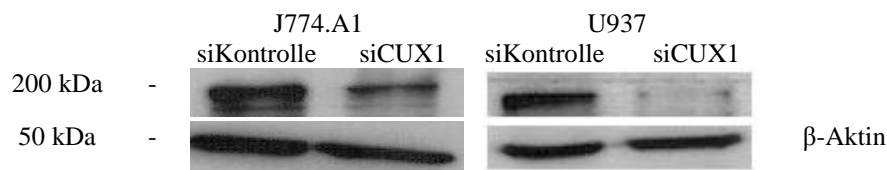


Abb. 4.9 Erniedrigte Migrationsrate der Panc1-Zellen bei Repression von CUX1 in J774.A1-Makrophagen.

(A) Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay mit J774.A1- und U937-Zellen im unteren Kompartiment. Die Migration der Panc1-Zellen in den Inserts wurde nach 8 h Inkubation quantifiziert. Die Anzahl migrierender Zellen wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo® Reagenz bestimmt und auf die Anzahl proliferierender Zellen normalisiert (Migration/Proliferation). Statistik: $p = 0,1$ bei dem repräsentativ dargestellten J774.A1-Versuch. (B) Die Repression von CUX1 in den Zelllinien wurde mittels Western-Blot kontrolliert. Dargestellt sind Daten repräsentativ für vier unabhängig voneinander durchgeführte Versuche.

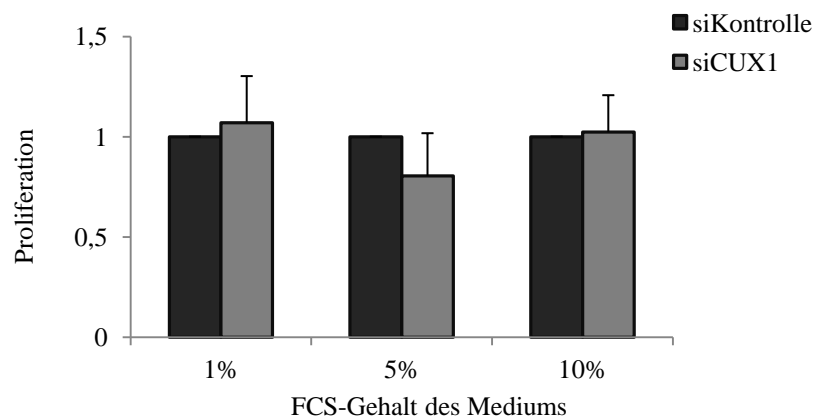
4.3.2.2.2 Die Repression von CUX1 in J774.A1-Makrophagen hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen

Wegen der beschriebenen Abschwächung der Migration der Pankreaskarzinomzellen bei transienter Repression von CUX1 in den J774.A1-Zellen sollte diese Makrophagen-Zelllinie auch in Bezug auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen untersucht werden.

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Pankreaskarzinomzellen (Panc1-Zellen) erfolgte mit Hilfe des BrdU-Assay (Abb. 4.10 A). Dazu erfolgte die Herstellung von konditioniertem Medium durch die Inkubation von J774.A1-Makrophagen, bei denen CUX1 transient durch siRNA reprimiert war und deren Kontrollzellen in Medium mit verschiedenen Konzentrationen von FCS. Dieses so gewonnene Medium wurde anschließend auf die Pankreaskarzinomzellen gegeben und nach 48-stündiger Inkubation die Proliferation gemessen.

Hierbei kam es zu keiner Abnahme der Proliferation der Panc1-Zellen bei Kontakt mit konditioniertem Medium von CUX1 negativen J774.A1-Zellen im Gegensatz zum Medium der Kontrollzellen.

A.



B.



Abb. 4.10 Keine Veränderung der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen (Panc1-Zellen) bei Repression von CUX1 in J774.A1-Zellen.

(A) Messung der Proliferation von Panc1-Zellen mittels BrdU-Assay nach Stimulation Zellen mit konditioniertem Medium unterschiedlichen FCS-Gehaltes für 48 h. (B) Die Repression von CUX1 in den J774.A1-Zellen wurde mittels Western-Blot kontrolliert. Dargestellt ist der Mittelwert, der drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente, nach Normalisierung der Kontrolle der einzelnen Versuche auf 1. Zusätzlich Abbildung eines repräsentativen Western-Blot für die durchgeführten Experimente.

Zusammenfassend konnte keine Reduktion der Proliferation der Panc1-Zellen bei Inkubation mit konditioniertem Medium der CUX1 reprimierten J774.A1-Zellen beobachtet werden.

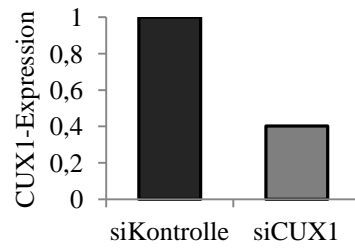
4.3.2.3 Veränderung des Genexpressionsprofils von J774.A1-Zellen nach Repression von CUX1

Der gezeigte Effekt, dass die transiente CUX1-Repression in den J774.A1-Makrophagen zu einer abgeschwächten Migration der Pankreaskarzinomzellen führte, war Ausgangspunkt für die nächsten Experimente. In diesen Experimenten sollte untersucht werden, welche Botenstoffe von den J774.A1-Makrophagen im Rahmen der tumorassoziierten Entzündungsreaktion produziert werden und somit das Tumorstadium und die Tumorentwicklung fördern.

Mit dem verwendeten Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors PCR-Array (SABiosciences Corporation) konnten 84 ausgewählte Gene, zu denen Chemokine und Rezeptoren gehören, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, auf ihre Expressionsstärke untersucht werden.

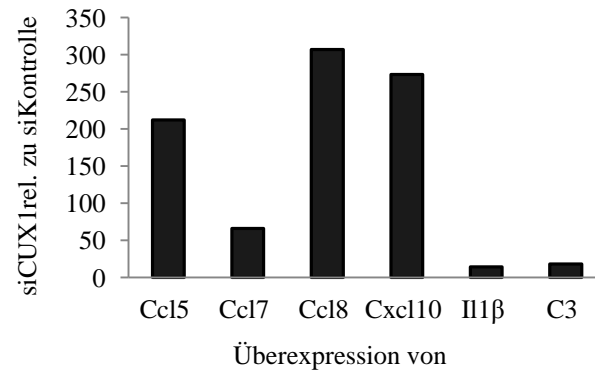
Hierzu wurde CUX1 mittels siRNA in J774.A1-Zellen transient ausgeschaltet. Um den Expressionsmodus von CUX1 in den Makrophagen vor Durchführung des PCR-Arrays zu erfassen, erfolgte die Durchführung einer Real-Time-Quantifizierungs-PCR (Abb. 4.11 A) mit den CUX1 negativen bzw. den Kontrollzellen (CUX1 positiv). Betrug die Repression von CUX1 in Bezug auf die Kontrolle 40 - 60 %, wurde der PCR-Array gestartet. Wie in Abbildung 4.11 B und C gezeigt, ergab die Genexpressionsanalyse (PCR-Array) 34 Gene, die in den CUX1 negativen Zellen signifikant überexprimiert waren ($p < 0,05$). Davon waren insgesamt 9 Chemokine, Zytokine sowie Rezeptoren, um einen Faktor von größer 10 überexprimiert, wobei CCL 8 im Gegensatz zu den Kontrollzellen am höchsten exprimiert war. Um den Faktor 2 bis 10 waren 25 Gene hochreguliert. Signifikant reprimierte Gene in den CUX1 negativen Zellen konnten mittels der Genexpressionsanalyse nicht identifiziert werden.

A.

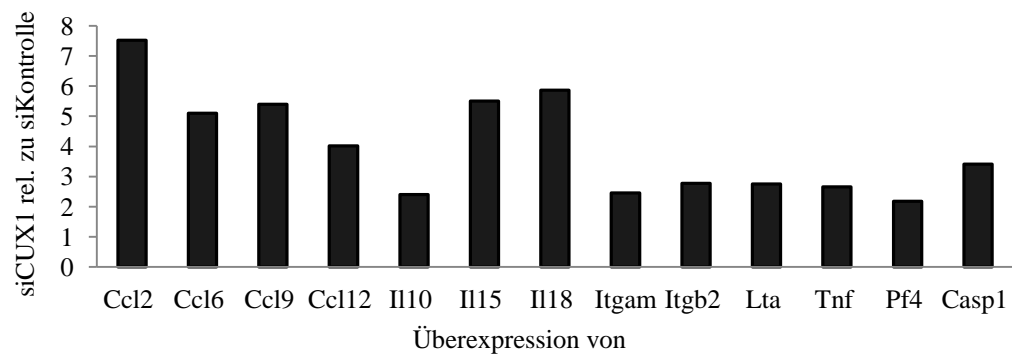


B. Chemokine und Zytokine

B1. Überexpression um den Faktor > 10



B2. Überexpression um den Faktor 2-10



C. Rezeptoren

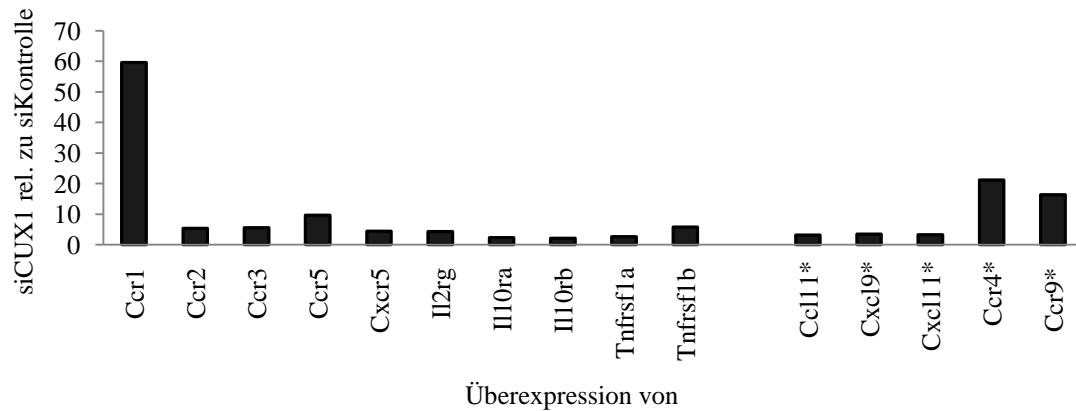


Abb. 4.11 Signifikante Überexpression von 34 verschiedenen Genen bei Repression von CUX1 in J774.A1-Makrophagen.

(A) Real-Time-Quantifizierungs-PCR zur Quantitätskontrolle der CUX1-Repression der J774.A1-Zellen vor Durchführung des Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors PCR Array. Dargestellt sind Daten einer für den PCR-Array verwendeten Probe. (B1) Chemokine und Zytokine, die signifikant um den Faktor größer 10 und den Faktor 2-10 (B2) hochreguliert waren. (C) Rezeptoren, die signifikant überexprimiert waren. Die Auswertung erfolgte nach drei unabhängig voneinander durchgeführten PCR-Arrays mit der vom Hersteller im Internet bereitgestellten Software (SABiosciences, 2008). Die statistische Auswertung im Rahmen dieser Software erfolgte mittels des t-Tests ($p > 0,05$). Es sind ausschließlich signifikant überexprimierte Gene dargestellt.

* Die Expression dieser Gene war in der Kontrolle und der untersuchten Probe so niedrig, dass das Ergebnis eine große Variationsbreite hat, so dass eine erhöhte Anzahl von Experimenten (>3) notwendig wäre, um die Ergebnisse zu validieren.

Durch die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Modulation von CUX1 einen Einfluss auf das von den Makrophagen sezernierte Chemokin-Profil hat.

5. Diskussion

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist die am häufigsten zum Tode führende Erkrankung des Gastrointestinaltraktes und weist folgende charakteristische Merkmale auf: Es zeigt eine schnelle Progression, frühe Metastasierung, wird meist in einem fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert und spricht nur eingeschränkt auf Chemo- und Strahlentherapie an. Zusätzlich zu diesen Eigenschaften ist das Adenokarzinom des Pankreas durch eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion charakterisiert (Bachem et al., 2008, Farrow et al., 2008). Diese Reaktion ist definiert als eine exorbitante Proliferation der Stromazellen, ausgelöst durch die Zellen des Tumors (Chu et al., 2007) und zeichnet sich durch ein komplexes Zusammenspiel von Epithelzellen, einwandernden Tumorzellen, Fibroblasten und Entzündungszellen aus (Mahadevan und Von Hoff, 2007). Die Interaktion zwischen den Tumorzellen und den Stromazellen, welche durch direkte Zell-Zell-Kontakte oder parakrin und autokrin wirksame Signalmoleküle stattfindet (Silverthorn, 2009), steuert einerseits die Entwicklung des Tumorstromas, andererseits beeinflussen die Stromazellen die Differenzierung, Migration und Proliferation der Tumorzellen (Zalatnai, 2006). Hierbei ist die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Proteasen und anderen bioaktiven Molekülen sowie die Kommunikation der Zellen während der desmoplastischen Reaktion in der Mikroumgebung des Pankreaskarzinoms Voraussetzung für die Entwicklung und Progression des Karzinoms (Aritzia et al., 2006, Muerkoster et al., 2004). Dies wird unterstützt durch Studien von Brust- und Prostatakarzinomen, die ebenfalls durch eine massive Stromareaktion gekennzeichnet sind (Ronnov-Jessen et al., 1996, Olumi et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Mikroumgebung des Pankreaskarzinoms mit der charakteristischen desmoplastischen Reaktion und die dort stattfindende Interaktion der Zellen genauer untersucht werden, da sie eine wichtige Grundlage für neue Therapieansätze darstellen könnte. In diesem Zusammenhang sollten mesenchymale Stromazellen und Makrophagen, als Hauptbestandteil der ausgeprägten desmoplastischen Reaktion, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Migration und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen untersucht werden.

5.1 Mesenchymale Stromazellen fördern Migration der Pankreaskarzinomzellen

Mesenchymale Stromazellen stellen eine heterogene Gruppe von Zellen dar, zu der unter anderem Fibroblasten und pankreatische Sternzellen gezählt werden, die als wichtige Bestandteile der Stromareaktion des Pankreaskarzinoms identifiziert wurden (Chu et al., 2007, Kleeff et al., 2007). Die Präsenz dieser Zellen ist mit einem erhöhten Wachstum und vermehrter Metastasierung der Tumorzellen vergesellschaftet (Hwang et al., 2008). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass pankreatische Sternzellen die Migration, Invasion und Proliferation der Pankreaskarzinomzellen verstärken. Zusätzlich konnte eine verminderte Apoptosebereitschaft dieser Zellen unter dem Einfluss der pankreatischen Sternzellen beobachtet werden (Bachem et al., 2008, Fujita et al., 2009, Lohr und Jesnowski, 2009, Qian et al., 2003, Kikuta et al., 2010). Um das Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen, wurde der Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay auf Grund der einfachen Durchführbarkeit und der schon erfolgten Etablierung als geeignete in vitro Untersuchungsmethode für die Zellmigration gewählt (Kleinman et al., 2001). Als Vorteile der Methode sind zu nennen, dass die Messung der Migration nach kurzer Zeit erfolgt, so dass weniger Störgrößen auftreten können, z.B. Apoptose der Zellen oder unterschiedliche Proliferationsraten der Pankreaskarzinomzellen bei wiederholter Versuchsdurchführung. Es handelt sich um eine Endpunktmessung (gleiche Inkubationszeit), wodurch die Ergebnisse der einzelnen Versuche vergleichbar werden. Als Nachteile des Assay sind zu nennen, dass eine große Zahl von Zellen in die Inserts gegeben wird, aber nur ca. 10 % der Zellen am Ende erfasst und nur die migratorisch aktiven Zellen in die Analyse mit einbezogen werden (Entschladen et al., 2005). Durch die Kokulturrexperimente mit Hilfe des Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay, bei denen sich eine erhöhte Migrationsrate der Pankreaskarzinomzellen bei Kontakt mit sezernierten Überständen von mesenchymalen Stromazellen zeigte, konnten insbesondere die Studien der Arbeitsgruppe Vonlaufen (2008) bestätigt werden, die ebenfalls mit Hilfe des Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay eine erhöhte Migration der Pankreaskarzinomzellen unter dem Einfluss von Fibroblasten beobachtet hatten. Die Arbeitsgruppe konnte zusätzlich noch eine Zunahme von Invasion und Proliferation der Pankreaskarzinomzellen durch die mesenchymalen Stromazellen (humane pankreatische Sternzellen) und eine Abnahme der Apoptosebereitschaft der Pankreaskarzinomzellen zeigen (Vonlaufen et al., 2008a,

Vonlaufen et al., 2008b). Im Rahmen dieser Arbeit konnten zusätzlich zu der vermehrten Migration der Pankreaskarzinomzellen im oberen Kompartiment des Assay bei ausgesäten mesenchymalen Stromazellen im unteren Kompartiment eine vermehrte Migration der Pankreaskarzinomzellen in den Inserts beobachtet werden, wenn auch im unteren Kompartiment Pankreaskarzinomzellen ausgesät wurden, was auch eine parakrine Interaktion von Pankreaskarzinomzellen untereinander nahelegt. Dieses wird durch Studien, die autokrin bzw. parakrin wirksame Mediatoren der Pankreaskarzinomzellen identifizierten, unterstützt (von Marschall et al., 2000, Arlt et al., 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten deutlich auf, dass eine Kommunikation über parakrine und autokrine Signalmoleküle zwischen den Zellen der desmoplastischen Reaktion stattfindet und die Migration der Pankreaskarzinomzellen durch mesenchymale Stromazellen und Pankreaskarzinomzellen selbst gesteigert wird.

5.2 Wirkung von CD34⁺-Fibroblasten auf die Migration und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen

Das erste Zielprotein dieser Arbeit, CD34, wird hauptsächlich durch hämatopoetische Stammzellen exprimiert, was auf eine essentielle Rolle von CD34 in der frühen Phase der Hämatopoese hinweist (He et al., 1992). Zusätzlich wird eine Funktion außerhalb der Differenzierung der Blutzellen vermutet, da CD34 auf embryonalen Fibroblasten detektiert werden konnte (Brown et al., 1991). Auch im Stroma verschiedener Organe treten vermehrt CD34⁺-Fibroblasten, die von zirkulierenden CD14⁺-Monozyten abstammen, auf (Nimphius et al., 2007, Kuroda et al., 2004, Barth und Westhoff, 2007). Die Veränderung des Stromas im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom ist begleitet durch einen Verlust dieser CD34-Expression und einer gleichzeitigen Veränderung des Phänotyps der vormals CD34⁺-Fibroblasten in α -SMA positive Myofibroblasten. Der für das Pankreaskarzinom charakteristische Verlust von CD34 kann stereotyp auch in anderen invasiven Karzinomen beobachtet werden und könnte daher eine Vorbedingung für eine Tumorzellinvasion in gesundes Gewebe sein. Das an das Karzinom grenzende Pankreasparenchym zeichnet sich hingegen durch eine vermehrte Anzahl dicht zusammenliegender CD34⁺-Fibroblasten aus. Grundsätzlich haben diese die Befähigung zur Migration und Angiogenese, produzieren Kollagen sowie Zytokine und können Antigene präsentieren (Barth und Westhoff, 2007). Auf Grund dieser Funktionen haben die CD34⁺-Fibroblasten eine wichtige Rolle bei der Beibehaltung der Integrität des Stromas

und bei der Bildung einer Barriere gegen die Invasion von Pankreaskarzinomzellen (Barth et al., 2002). Zur weiteren Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung dieser vermehrten Anzahl von CD34⁺-Fibroblasten im an das Pankreaskarzinom grenzenden Parenchym wurde die Migrations- und Proliferationsrate von Pankreaskarzinomzellen untersucht.

Hierbei zeigte sich keine eindeutige Veränderung des Migrations- und Proliferationsverhaltens der Pankreaskarzinomzellen unter dem Einfluss von durch CD34⁺-Fibroblasten produzierte Signalstoffe. Ein Ursache hierfür könnte sein, dass das CD34 tragende Plasmid in den verwendeten Klonen zwar in das Wirtsgenom integriert, transkribiert und translatiert wurde, was durch Western-Blot-Analysen und die Immunfluoreszenzbilder nachgewiesen werden konnte, aber möglicherweise keine ausreichende Funktionalität besaß. Darauf hinweisen könnte, dass das CD34 in den Fibroblasten bei transienter Transfektion nicht, wie erwartet, überwiegend als Transmembranprotein zu detektieren war (Lanza et al., 2001), sondern vor allem perinukleär. Zwar gibt es Daten, die von intrazellulären Speichern für CD34 berichteten, aus denen CD34 auf extrazelluläre Signale hin in die Membran eingebaut werden können, die Bedeutung dieser intrazellulären Speicher ist jedoch nicht bekannt (Fernandez et al., 2000, Fackler et al., 1992). Ein weiterer Grund für den fehlenden Einfluss der CD34⁺-Fibroblasten auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen könnte sein, dass die Zellen beispielsweise durch die stabile Transfektion oder das Aushungern (0 % FCS) vor der Inkubation mit den Pankreaskarzinomzellen so geschädigt wurden, dass sie keine Botenstoffe mehr produzierten. Auch könnte ein direkter Zell-Zellkontakt für die Interaktion der Pankreaskarzinomzellen und der CD34⁺-Fibroblasten vonnöten sein (Fujita et al., 2009). Desweiteren könnte für die Beeinflussung der Proliferation der Pankreaskarzinomzellen eine längere Inkubation der Pankreaskarzinomzellen bzw. ein FCS-Gehalt von 10% des konditionierten Mediums der CD34⁺-Fibroblasten notwendig sein. Dies wird dadurch unterstützt, dass im Rahmen dieser Arbeit unter diesen definierten Bedingungen eine reproduzierbare, moderate, aber nicht signifikante Zunahme der Proliferation der Pankreaskarzinomzellen beobachtet werden konnte. Eine weitere mögliche Erklärung für die Ergebnisse dieser Arbeit könnte sein, dass die von den Fibroblasten gebildete Barriere gegen die Invasion von Pankreaskarzinomzellen (Barth et al., 2002) nicht durch Ausschüttung von antimigratorisch, antiproliferativ wirkenden Zytokinen, sondern z.B. durch die Aktivierung des Immunsystems und Kollagensynthese der CD34⁺-Fibroblasten aufgebaut wird oder die CD34⁺-Fibroblasten

per se möglicherweise keine Effekt auf die Migration und Proliferation der Zellen in ihrer Umgebung ausüben. Allerdings sollte die Interaktion der CD34⁺-Fibroblasten und Pankreaskarzinomzellen in weiteren Experimenten untersucht werden, z.B. durch direkte Kokultur dieser zwei Zelltypen oder der Verwendung von nativ gewonnenen CD34⁺-Fibroblasten, da dieses Zusammenspiel bei der Entwicklung des Tumorstromas eine wichtige Rolle spielen könnte.

5.3 Wirkung von CUX1 in mesenchymalen Stromazellen auf die Migrationsrate von Pankreaskarzinomzellen

CUX1, das zweite Zielgen dieser Arbeit, ist in Zellen epithelialen Ursprungs, primären Tumoren und Krebszelllinien exprimiert (Goulet et al., 2006, Sansregret und Nepveu, 2008). Auch in Vorarbeiten der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von CUX1 in mesenchymalen Stromazellen, wie Fibroblasten und pankreatische Sternzellen, nachgewiesen werden. Der Transkriptionsfaktor CUX1 ist an der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zellzyklusprogression beteiligt (Nepveu, 2001). Andere Studien identifizierten CUX1 als Modulator der Zellmigration und konnten zeigen, dass eine Repression von CUX1 in verschiedenen Tumor-Zelllinien zu einer reduzierten Motilität und Invasivität der Zellen in vivo und in vitro führt (Michl et al., 2005). Im klinischen Kontext war eine erhöhte CUX1-Expression mit entdifferenzierten (G3) Pankreas- und Mammakarzinomen assoziiert und korrelierte mit einer verminderten Überlebensrate bei den Mammakarzinompatienten (Goulet et al., 2002, Michl et al., 2005). Aus der Beobachtung heraus, dass CUX1 als Modulator der Zellmotilität wirkt, ergab sich die Frage, inwiefern sich die Reprimierung von CUX1 in mesenchymalen Stromazellen auf die Interaktion mit den Pankreaskarzinomzellen auswirkt. Zunächst wurde die Migrationsrate der Pankreaskarzinomzellen unter dem Einfluss von sezernierten Überständen von CUX1-reprimierten bzw. CUX1-exprimierenden Fibroblasten (NIH3T3-Zellen) bzw. pankreatischen Sternzellen (RLT-PSC) untersucht. Hierbei konnte kein Einfluss auf die Migrationsrate der Pankreaskarzinomzellen im oberen Kompartiment des Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay festgestellt werden. Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, dass für die Weitergabe von CUX1 vermittelten Eigenschaften ein direkter Zellkontakt bestehen muss (Fujita et al., 2009) oder CUX1 die Migration nicht parakrin durch Modulation von sezernierten Signalmolekülen steuert. Zudem kann es sein, dass die Sekretion von parakrin wirksamen Molekülen durch die CUX1

reprimierten mesenchymalen Stromazellen zu gering war, um eine Veränderung der Migration der Pankreaskarzinomzellen im Gegensatz zu den CUX1-exprimierenden NIH3T3- und RLT-PC-Zellen zu bewirken. Zusätzlich könnte eine Ursache darin liegen, dass die transiente Reprimierung von CUX1 in den mesenchymalen Zellen nicht ausreicht, die Produktion von Signalmolekülen so zu beeinflussen, dass eine Veränderung der Migrationsrate der Pankreaskarzinomzellen daraus resultiert. Eine Lösung dieses Problems könnte die erneute Durchführung der Versuche mit stabil transfizierten CUX1-reprimierten mesenchymalen Zellen sein. Da CUX1 in den Fibroblasten verstärkt exprimiert wird, wirkt es auf diese selbst promigratorisch (Michl et al., 2005). Inwiefern sich der Transkriptionsfaktor auf die Migration und Proliferation der Pankreaskarzinomzellen in der Umgebung der Fibroblasten auswirkt, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht gezeigt werden.

5.4 Expression von CUX1 in Entzündungszellen und die Wirkung von TGF- β auf diese CUX1-Expression

Die Präsenz von Makrophagen stellt eines der Hauptmerkmale der tumorassoziierten Entzündungsreaktion dar (Pollard, 2004, Balkwill et al., 2005). Da diese Zellpopulation in der Lage ist, die Progression und Therapieresistenz von Tumoren zu stimulieren, ist es essentiell, deren Rolle in diesem Zusammenhang zu untersuchen. Tumorassoziierte Makrophagen stammen von zirkulierenden Monozyten ab, die durch vom Tumor stammende Chemokine und Wachstumsfaktoren angelockt und anschließend im Stroma des Tumors ortsständig werden (Sica et al., 2006, Sica et al., 2008b). Abhängig von ihrem Differenzierungsgrad und Aktivierungsstadium können die Makrophagen die Entwicklung von Neoplasien inhibieren oder fördern (Montuenga et al., 2007). Im Tumorstroma haben sie einerseits die Fähigkeit, die Tumorentwicklung durch Ausschüttung inflammatorischer Zytokine zu verlangsamen (M1-Makrophagen), (Biswas et al., 2008), andererseits ist die Dichte der Makrophagen in etablierten Tumoren vergesellschaftet mit einer vermehrten Angiogenese, Tumordinvasion und schlechter Prognose. Diese Makrophagen werden als tumorassoziierte Makrophagen bezeichnet (M2-Makrophagen), (Bingle et al., 2002, Tsutsui et al., 2005, Esposito et al., 2004, Lewis und Pollard et al., 2006). Wie Makrophagen bzw. Monozyten die Invasion des Tumors in vitro beeinflussen können, sollte anhand des Transkriptionsfaktors CUX1 untersucht werden, da dieser bereits als Modulator der Zellmigration und Invasion identifiziert

wurde (Michl et al., 2005, Michl et al., 2006b). Zwar berichtet eine Studie, die den Einfluss von CUX1 auf die Differenzierung von Megakaryozyten in Makrophagen, Granulozyten und Erythrozyten untersuchte, von einer erniedrigten CUX1 Bindungsaktivität in Makrophagen (Martin-Soudant et al., 2000). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass CUX1 in Makrophagen und Monozyten erhöht exprimiert ist. Diese erhöhte CUX1-Expression könnte für die tumorbegünstigende Wirkung der Entzündungszellen auf die Pankreaskarzinomzellen verantwortlich sein. Zunächst sollte der Effekt von TGF- β auf die CUX1-Expression der Entzündungszellen untersucht werden, da die Arbeitsgruppe Michl CUX1 als Transkriptionsfaktor während der TGF- β -Signaltransduktion und somit als Vermittler dessen promigratorischer und proinvasiver Wirkung identifizieren konnte (Michl et al., 2005, Michl et al., 2006a). Es existieren unterschiedliche Studien über die duale Rolle von TGF- β während der Tumورprogression (Bierie und Moses, 2006b, Ellenrieder et al., 2001, Mahadevan und Von Hoff, 2007). So wird es einerseits als Zytokin beschrieben, welches in den frühen Stadien eines Tumors dessen Wachstum vermindert. Im fortgeschrittenen Stadium eines Karzinoms kommt es nicht nur zu einem Verlust der wachstumshemmenden Wirkung von TGF- β auf die Tumorzellen, sondern TGF- β wird zu einem onkogen wirkenden Wachstumsfaktor, welcher die Proliferation, Angiogenese, Invasion, Metastasierung und Immunsuppression fördert (Seoane, 2006, Roberts und Wakefield, 2003). In Bezug auf Entzündungszellen führt TGF- β zu einer erhöhten Migration von Monozyten und deren vermehrten Differenzierung zu Makrophagen. In Makrophagen hemmt das Zytokin die Ausschüttung von proinflammatorischen Chemokinen und führt so zu einer verminderten Immunreaktion des Stromas auf den Tumor. Zusammenfassend wirkt TGF- β als Modulator der Chemotaxis und Genexpression der Immunzellen (Bogdan und Nathan, 1993, Bierie und Moses, 2006a, Kitamura, 1997). Die in dieser Arbeit, infolge der Stimulation mit TGF- β , gezeigte Erhöhung der CUX1-Expression der Makrophagen weist darauf hin, dass TGF- β über den Transkriptionsfaktor CUX1 auf diese Zellen promigratorisch wirkt. Die so in das Tumorstroma gelangten Makrophagen könnten dann, je nach Differenzierungsgrad, Aktivierungsstadium und je nach lokalen Signalen, die Tumورprogression fördern (Bingle et al., 2002, Biswas et al., 2008). Zusammenfassend wird TGF- β von Tumorzellen sowie von tumorassoziierten Makrophagen sezerniert und wurde als M2-polarisierender, die Tumورprogression positiv modulierender Faktor beschrieben (Mantovani et al., 2004, Sica et al., 2008a). Basierend auf diesen Befunden sollten weitere Studien über das Migrationsverhalten von Makropha-

gen unter dem Einfluss von TGF- β bzw. CUX1 erfolgen, um die daran beteiligten intrazellulären Signalwege weiter aufzuklären.

5.5 Wirkung von CUX1 in Makrophagen auf die Migration und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen

Die Wirkung von tumorassoziierten Makrophagen beruht auf der Ausschüttung von Zytokinen, die zu einem erhöhten Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung führen (Pollard, 2004). Die Produktion dieser Mediatoren in den Makrophagen könnte durch CUX1 beeinflusst werden und nachfolgend eine verstärkte Migration und Proliferation der Pankreaskarzinomzellen im Rahmen der Tumor-Stroma-Interaktion zur Folge haben. Die Untersuchung des Einflusses der CUX1-Repression in U937-Zellen auf die Migrationsrate der Pankreaskarzinomzellen ergab im Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay keine Veränderung. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass diese Zellen, die noch über viele Monozyteneigenschaften entsprechend ihres histiozytären Originals verfügen (Strefford et al., 2001, Sundstrom und Nilsson, 1976), auf Grund der noch nicht vorhandenen Differenzierung zu ortsständigen Makrophagen des Tumorstromas unabhängig von ihrer CUX1-Expression keine Wirkung auf Pankreaskarzinomzellen haben. Im Gegensatz dazu konnte durch die Repression von CUX1 in J774.A1-Makrophagen eine Abnahme der Migration der Pankreaskarzinomzellen im Vergleich zu den Kontrollmakrophagen (CUX1-positiv) gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor CUX1 die Migration beeinflusst, welches sich nicht nur durch eine verminderte Migrationsrate von CUX1 reprimierten Zellen selbst ausdrückt (Michl et al., 2006b, Michl et al., 2003), sondern auch über die Produktion und Sekretion von Signalmolekülen auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen in der Umgebung auswirkt. Diese Hypothese konnte durch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Veränderung des Zytokinprofils der Makrophagen bei unterschiedlicher Expressionsstärke von CUX1 bestätigt werden. Die Funktion der untersuchten inflammatorischen Zytokine im Rahmen der tumorassoziierten Entzündungsreaktion, welche gemäß Anzahl und Position der Cysteinreste in vier Hauptgruppen - CXC, CC, C und CX3C - unterteilt werden (Murphy et al., 2000), wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während Studien einerseits einen Zusammenhang zwischen der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen mit einem verminderten Wachstum von Karzinomzellen sehen (Shen et al., 2002, Tonouchi et al., 2002), existieren gegensätzliche Daten, die

ein Profil von sezernierten antiinflammatorischen Zyto- und Chemokinen mit einer erhöhten Proliferation und Invasionskapazität der Pankreaskarzinomzellen und Angiogenese in Verbindung bringen (Kleeff et al., 1999, Balkwill et al., 2005, Farrow et al., 2008).

CUX1 könnte die Expression von proinflammatorischen Chemokinen auf mRNA-Ebene reprimieren und so die Tumorprogression fördern. Überraschenderweise waren im Rahmen der durchgeführten Genexpressionsanalyse in den Kontrollzellen im Gegensatz zu den CUX1-negativen Zellen keine Zytokin-Gene vermehrt exprimiert (durch CUX1 hochreguliert). CUX1 scheint also in diesem Zusammenhang nicht die Transkription von Chemokinen zu stimulieren. Im Gegensatz dazu waren in den CUX1-negativen Zellen im Kontrast zu den Kontrollzellen in der Hauptsache verschiedene CC-Chemokinen vermehrt exprimiert (CCL8, CCL5, CCL7, CCL2, CCL9, CCL6, CCL12 - geordnet nach Höhe der Überexpression, beginnend mit dem höchsten Wert). Diese Gene werden also mutmaßlich durch CUX1 reprimiert. Dies passt zu der in der Literatur beschriebenen Tatsache, dass CUX1 abhängig vom zellulären Kontext nicht nur transkriptionell aktivieren, sondern distinkte Gene transkriptionell zu reprimieren vermag (Michl et al., 2005).

Viele der im Rahmen dieser Arbeit durch CUX1 reprimierten Chemokine, insbesondere CCL7 und CCL8, sind wichtig für die Rekrutierung von Immunzellen in die Mikroumgebung von Tumoren, wie beispielsweise Mamma-, Zervix- und Pankreaskarzinomen (Pollard, 2004, Wu et al., 2006). Durch CCL2 und CCL5 kommt es neben einer erhöhten Infiltration von tumorassoziierten Makrophagen in das Tumorstroma zusätzlich zur Produktion von Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) durch die Makrophagen und so zu einer vermehrten Tumorzellmigration und Invasion (Kakinuma und Hwang, 2006). Andererseits gibt es Daten, die hohe Serumlevel von CCL2 in vivo mit einer reduzierten Proliferation des Karzinoms und einer erhöhten Überlebensrate in Verbindung bringen und CCL2 insgesamt als negativen Regulator der Progression des Pankreaskarzinoms sehen (Monti et al., 2003, Mantovani et al., 2004). Letzteres scheint durch die Ergebnisse dieser Arbeit, Überexpression von CCL2 bei CUX1-Repression in Makrophagen, verbunden mit einer Abnahme von Migration von Pankreaskarzinomzellen, bestätigt werden zu können und unterstreicht die Rolle von CCL2 bei der Verhinderung der Tumorprogression.

CXCL10 ist ein weiteres Chemokin, welches nach Repression von CUX1 in den Makrophagen hochreguliert wird. Die Chemokinfamilie CXC, vor allem die Chemokine

CXCL1, -2, -3, und CXCL8, sind an der Proliferation und am Wachstum von Tumorzellen beteiligt. Zusätzlich fördern manche dieser Chemokine die Angiogenese im Tumor und begünstigen so dessen Progression (Miyamoto et al., 1998, Kakinuma und Hwang, 2006, Shi et al., 1999). Über die Funktion von CXCL10 gibt es hingegen gegensätzliche Angaben. Einerseits zeigt eine kürzlich durchgeführte Studie, die den direkten Effekt von CXCL10 auf kolorektale Karzinomzellen untersucht, dass dieses Chemokin direkt auf die Tumorzellen wirkt und deren promalignen/ prometastatischen Eigenschaften fördert (Zipin-Roitman et al., 2007). Andererseits wirkt der Chemokinligand antiangiogenetisch und inhibiert so die Tumorprogression (Kakinuma und Hwang, 2006). Möglicherweise kann CXCL10 nicht nur über seine antiangiogenetische Wirkung, sondern auch direkt die Progression von Tumoren verhindern. Die vermehrte Ausschüttung von CXCL10 durch die Makrophagen könnte so für die beobachtete Abnahme der Migration bei CUX1-Repression mitverantwortlich sein. Interessanterweise war die Genexpression des Chemokins CXCL1, ein Modulator von Inflammation, Wundheilung, Angiogenese und Tumorgenese in unserem Zellsystem nicht CUX1 abhängig reguliert. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie, die eine CUX1-abhängige Regulation von CXCL1 in Melanozyten beschrieb (Nirodi et al., 2001). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die Transkription des CXCL1 Gens zwar in Melanomzelllinien und normalen retinalen Pigmentzellen durch CUX1 reguliert wird, nicht aber in Immunzellen.

Chemokine bzw. Zytokine vermitteln ihre biologischen Effekte durch die Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen. Immunzellen, Endothelzellen und Tumorzellen exprimieren Chemokinrezeptoren und können so auf den Chemokingradienten reagieren. Die gemeinsame Hauptaufgabe dieser Rezeptoren ist die Direktion der Leukozytenwanderung und damit verbunden die Regulation der Immunreaktion (Murphy et al., 2000). Am höchsten war im Rahmen dieser Arbeit CCR1 von insgesamt zehn Chemokinrezeptoren in den CUX1 reprimierten Makrophagen im Gegensatz zu den Kontrollzellen signifikant überexprimiert. CCR1 bindet eine Vielzahl von inflammatorisch wirksamen Chemokinen und kann über die verschiedenen Leukozytensubtypen die Immunantwort auf Entzündungen positiv oder negativ beeinflussen. Der am häufigsten auf Karzinomzellen exprimierte Chemokinrezeptor ist der CXC-Rezeptor CXCR4. CXCL12, welches unter anderem in Tumoren des Pankreas detektiert werden konnte, ist der einzige Ligand für diesen Rezeptor und wird von den Zellen des Stromas produziert (Koshiba et al., 2000). Es spielt eine Rolle bei der Angiogenese und Metastasierung von Tumoren. Die Aktivierung von CXCR4 durch

CXCL12 hat zur Folge, dass die Karzinomzellen verstärkt migrieren und so ihre Invasionskapazität erhöhen (Balkwill, 2004, Raman et al., 2007). In der hier durchgeführten Genexpressionsanalyse konnte keine signifikante Veränderung der Expression von CXCL12 der Makrophagen durch die CUX1-Repression in den J774.A1-Makrophagen beobachtet werden (Daten nicht dargestellt). Ein Grund hierfür könnte sein, dass die verwendeten Makrophagen die Migration der Pankreaskarzinomzellen nicht über die Achse CXCR4-CXCL12 beeinflussen.

Das im Rahmen dieser Arbeit signifikant vermehrt exprimierte Zytokin IL10 bei Repression von CUX1 in den J774.A1-Makrophagen hat neben immunsuppressiven und antiinflammatorischen Effekten auch hemmende Effekte auf die Invasivität und Migration von Tumorzellen (Adris et al., 1999). Auch IL1 β und TNF α , so wie IFN γ , welches nicht signifikant erhöht war, zeigen in in vitro Experimenten eine direkte antiproliferative, proapoptotische Wirkung auf Pankreaskarzinomzellen. Gleichzeitig erhöht sich die Ausschüttung von proinflammatorischen Chemokinen, wenn Tumorzellen mit diesen Zytokinen stimuliert werden (Monti et al., 2003). Die Repression von CUX1 könnte so zur Folge haben, dass die Makrophagen durch die Ausschüttung der Zytokine IL1 β , IL10 und TNF α die Migration und Proliferation der Pankreaskarzinomzellen aktiv vermindern können.

Auf Grund der Komplexität des Chemokin-Netzwerkes (Balkwill, 2004, Entschladen et al., 2005) sollte oder kann die Abnahme der Migration bei CUX1-Repression nicht einem einzelnen Chemokin zugeschrieben werden. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch Studien, die eine zentrale Rolle von CUX1 in der Koordination eines Genexpressionsprogramms, das mit Zellmotilität, Metastasierungsrate, Tumorprogression assoziiert ist, konstatierten (Michl et al., 2005). Darüber hinaus legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass CUX1 die Expression antimigratorisch und antiproliferativ wirksamer Zytokine und Chemokine in Makrophagen reprimiert. Die Detailcharakterisierung und Validierung dieser Screening-Ergebnisse sollte Gegenstand künftiger Studien sein. Als Fernziel könnte die therapeutische Interferenz auf Ebene sezernierter Chemokine im Stroma einen neuartigen Ansatz zur Hemmung der Tumorprogression und Metastasierung darstellen.

6. Zusammenfassung

Eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion ist charakteristisch für das Adenokarzinom des Pankreas. Diese zeichnet sich durch ein komplexes Zusammenspiel von Tumorzellen und den Zellen des Stromas, wie z.B. Zellen mesenchymalen Ursprungs und Immunzellen, aus. Die Interaktion der Zellen hat einen Einfluss auf die Proliferation, Migration und nachfolgende Invasion der Pankreaskarzinomzellen und wird unter anderem durch die Ausschüttung von autokrin und parakrin wirksamen Signalmolekülen der Zellen gleichermaßen möglich. Ein besseres Verständnis der Interaktion der Zellen des Pankreaskarzinoms und seiner Mikroumgebung könnte zu neuen Therapieoptionen des Pankreaskarzinoms führen.

In dieser Arbeit wurde in Kokultorexperimenten die Migration und Proliferation von Pankreaskarzinomzellen unter dem Einfluss von mesenchymalen Stromazellen und Makrophagen sowie den durch diese Zellen sezernierten Chemokinen untersucht. Zunächst konnte im durchgeführten Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay eine erhöhte Migrationsrate der Pankreaskarzinomzellen bei Kontakt mit sezernierten Überständen von mesenchymalen Stromazellen und Pankreaskarzinomzellen selbst gezeigt werden.

Als erstes von zwei durch Stromazellen exprimierten Proteinen, die diese Effekte potenziell beeinflussen, wurde die parakrine Wirkung des Transmembranproteins CD34 untersucht. Dies ist vor allem auf Fibroblasten im am Tumorgewebe angrenzenden Parenchym exprimiert. Hierzu wurde das Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay zur Untersuchung der Migration der Pankreaskarzinomzellen unter dem Einfluss von sezernierten Chemokinen stabil transfizierter CD34⁺-NIH3T3-Zellen durchgeführt, zur Untersuchung der Proliferation das CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay. Diese Experimente konnten keinen eindeutigen Einfluss der sezernierten Überstände von stabil mit CD34 transfizierten Fibroblasten auf die Migration und Proliferation der Pankreaskarzinomzellen zeigen, was nahelegt, dass die CD34-Expression nicht mit einer Modulation der Sekretion von Chemokinen assoziiert ist.

Als zweites Protein wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors CUX1, welcher als wichtiger Modulator der Tumordinvasion im Pankreaskarzinom fungiert und durch TGF- β reguliert wird, auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen untersucht. In Vorarbeiten konnte mittels Western-Blot-Analysen gezeigt werden, dass CUX1 sowohl in Zelllinien mesenchymalen Ursprungs, als auch in Makrophagen und Monozyten verstärkt

exprimiert wird. Die Repression von CUX1 in den mesenchymalen Zellen ergab im Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay keine Veränderung des Migrationsverhaltens der Pankreaskarzinomzellen im oberen Kompartiment. In Makrophagen konnte zunächst die Regulation der Expression des Transkriptionsfaktors CUX1 durch TGF- β nachgewiesen werden. In den Kokultorexperimenten der CUX1-reprimierten U937-Makrophagen bzw. Kontrollzellen mit den Pankreaskarzinomzellen ergab sich kein Unterschied in der Migrationsrate der Pankreaskarzinomzellen, wohingegen sich eine verminderte Migrationsrate dieser Zellen bei Kontakt mit sezernierten Überständen von CUX1-reprimierten J774.A1-Makrophagen im Gegensatz zur Kontrolle zeigte. Die Proliferationsrate der Pankreaskarzinomzellen blieb im BrdU-Assay bei Inkubation mit konditioniertem Medium von CUX1 negativen J774.A1-Makrophagen im Gegensatz zur Kontrolle unverändert. Im Anschluss konnten mit Hilfe von Expressionsanalysen von den J774.A1-Makrophagen ausgeschüttete proinflammatorische Zytokine, Chemokine und deren Rezeptoren identifiziert werden, deren Expression durch CUX1 runterreguliert wird.

Schlussfolgernd zeigen die Daten dieser Arbeit auf, dass die Interaktion zwischen Tumorzellen und mesenchymalen Stromazellen bzw. Makrophagen eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression spielt. Inwiefern sich die Expression von CD34 in mesenchymalen Stromazellen auf diese Interaktion auswirkt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die CUX1-Expression in bestimmten Makrophagenzelllinien jedoch scheint die Migration von Pankreaskarzinomzellen durch Sekretion von Signalmolekülen positiv zu beeinflussen. Diese CUX1-Expression der Makrophagen wird durch TGF- β induziert. Gleichzeitig ist der Transkriptionsfaktor CUX1 für ein Genexpressionsmuster verantwortlich, das die Expression von antiproliferativ und antimigratorisch wirksamer Zytokine und Chemokine hemmt und so die Tumorzellinvasion und Proliferation parakrin fördern kann. Die Unterbrechung der CUX1 vermittelten Tumordinvasion könnte ein Ansatz für neue Therapieoptionen des Pankreaskarzinoms sein.

Abstract

A universal feature of the pancreatic ductal adenocarcinoma is the extensive desmoplastic reaction. It is characterized by a complex interplay between tumour cells and stromal cells, of mesenchymal origin and immune cells. The interplay between cells can influence proliferation, migration and subsequent invasion of pancreatic cancer cells. While the precise pathogenic mechanisms involved remains to be elucidated, autocrine and paracrine signaling molecules are thought to play a role. A better understanding of the interactions between pancreatic cancer cells and the local microenvironment could lead to new therapeutic options of the pancreatic ductal adenocarcinoma. The aim of the present study was to investigate the effect of the pathogenic microenvironment on pancreatic tumour cell proliferation as well as migration and to investigate the role of CD34 and CUX1 in mediating these effects.

In order to examine the effect of the local microenvironment, mesenchymal stromal cells were co-cultured with pancreatic tumour cells in a Boyden Chamber Chemotaxis Assay. The experiments showed that supernatants from mesenchymal stromal cells induced pancreatic tumour cell migration. Increasing migration was also observed when tumour cells were cultured with supernatants from pancreatic cancer cells themselves.

To examine the paracrine effect of the transmembrane protein CD34, which is expressed mainly on fibroblasts in the parenchyma adjacent to the tumour tissue NIH3T3 fibroblast cell line was stably transfected with CD34. After that pancreatic tumour cell migration and proliferation were quantified by Boyden Chamber Chemotaxis Assay and CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay. In the experiments the supernatants or the conditioned medium from transfected CD34⁺-NIH3T3 cells had no effect on pancreatic tumour cell proliferation and migration. Therefore it may be suggested that the CD34 expression of the fibroblasts does not modulate the secretion of chemokines by these cells.

This study then examined the effect of the transcription factor CUX1 on pancreatic cancer cells. The expression of CUX1 was assessed in macrophage and monocyte cells by western blot. Here the CUX1 protein was highly expressed on macrophage and monocyte cells. In macrophages the expression of the transcription factor CUX1 was regulated by TGF- β . In the Boyden Chamber Chemotaxis Assay supernatants from CUX1 suppressed mesenchymal cells had no effect on pancreatic tumour cell migration.

Coculture of CUX1-suppressed U937 macrophages or control cells with pancreatic cancer cells had also no effect on pancreatic tumour cells migration rate. In contrast supernatants from CUX1-repressed J774.A1 macrophages decreased pancreatic tumour cell migration, compared to media from control cells which showed no effect. In the performed BrdU Cell Proliferation Assay conditioned media from CUX1 negative macrophages or control cells had no effect on pancreatic cancer cells proliferation. Finally the expression of chemokines, cytokines and their receptors by J774-A1 macrophages was quantified by real-time PCR. The expression profiling showed that CUX1 decreased the expression of chemokines, cytokines and their receptors involved in the inflammatory response to invading tumour cell.

In summary it can be presumed that interactions of tumour cells, mesenchymal stroma cells or immune cells may play an important role in tumour progression. To what extent the expression of CD34 in mesenchymal stroma cells interferes with the interaction between the different types of cells could not be clarified. In contrast CUX1 is highly expressed on macrophages, is regulated by TGF- β and positively induces migration of pancreatic cancer cells. Furthermore CUX1 inhibits the expression of anti-proliferative and anti-inflammatory chemokines, cytokines and their receptors and thus promotes tumor cell invasion and proliferation. Therefore the interruption of the CUX1 mediated tumour invasion could be a new therapeutic option for the pancreatic ductal adenocarcinoma.

7. Literaturverzeichnis

Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN (2001): Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 166 (12): 7556-62.

Adris S, Klein S, Jasnits M, Chuluyan E, Ledda M, Bravo A, Carbone C, Chernajovsky Y, Podhajcer O (1999): IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response. *Gene Ther* 6 (10): 1705-12.

Alberts SR, Gores GJ, Kim GP, Roberts LR, Kendrick ML, Rosen CB, Chari ST, Martenson JA (2007): Treatment options for hepatobiliary and pancreatic cancer. *Mayo Clin Proc* 82 (5): 628-37.

Andren-Sandberg A, Hoem D, Backman PL (1999): Other risk factors for pancreatic cancer: hormonal aspects. *Ann Oncol* 10 Suppl 4: 131-5.

Ariztia EV, Lee CJ, Gogoi R, Fishman DA (2006): The tumor microenvironment: key to early detection. *Crit Rev Clin Lab Sci* 43 (5-6): 393-425.

Arlt A, Vorndamm J, Muerkoster S, Yu H, Schmidt WE, Folsch UR, Schafer H (2002): Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 62 (3): 910-6.

Aufiero B, Neufeld EJ, Orkin SH (1994): Sequence-specific DNA binding of individual cut repeats of the human CCAAT displacement/cut homeodomain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (16): 7757-61.

Bachem MG, Zhou S, Buck K, Schneiderhan W, Siech M (2008): Pancreatic stellate cells--role in pancreas cancer. *Langenbecks Arch Surg* 393 (6): 891-900.

Balkwill F (2004): Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4 (7): 540-50.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A (2005): Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7 (3): 211-7.

Bardeesy N, DePinho RA (2002): Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2 (12): 897-909.

Barth PJ, Ebrahimsade S, Hellinger A, Moll R, Ramaswamy A (2002): CD34+ fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. *Virchows Arch* 440 (2): 128-33.

Barth PJ, Westhoff CC (2007): CD34+ fibrocytes: morphology, histogenesis and function. *Curr Stem Cell Res Ther* 2 (3): 221-7.

Beger HG, Rau B, Gansauge F, Poch B, Link K (2003): Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. *World J Surg* 27 (10): 1075-84.

Beyer M, Schultze JL (2008): Immunoregulatory T cells: role and potential as a target in malignancy. *Curr Oncol Rep* 10 (2): 130-6.

Bierie B, Moses HL (2006a): Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* 6 (7): 506-20.

Bierie B, Moses HL (2006b): TGF-beta and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17 (1-2): 29-40.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002): The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196 (3): 254-65.

Bissell MJ, Radisky D (2001): Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1 (1): 46-54.

Biswas SK, Sica A, Lewis CE (2008): Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* 180 (4): 2011-7.

Blochlinger K, Jan LY, Jan YN (1991): Transformation of sensory organ identity by ectopic expression of Cut in Drosophila. *Genes Dev* 5 (7): 1124-35.

Bodmer R, Barbel S, Sheperd S, Jack JW, Jan LY, Jan YN (1987): Transformation of sensory organs by mutations of the cut locus of D. melanogaster. *Cell* 51 (2): 293-307.

Boffetta P, Aagnes B, Weiderpass E, Andersen A (2005): Smokeless tobacco use and risk of cancer of the pancreas and other organs. *Int J Cancer* 114 (6): 992-5.

Bogdan C, Nathan C (1993): Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci* 685: 713-39.

Bohmig M, Rosewicz S (2004): Pankreaskarzinom. *Z Gastroenterol* 42 (3): 261-8.

Boyden S (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115: 453-66.

Brand R (2004): Pancreatic cancer. *Dis Mon* 50 (10): 545-55.

Brown J, Greaves MF, Molgaard HV (1991): The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol* 3 (2): 175-84.

Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A (1994): Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1 (1): 71-81.

Burris HA 3rd (2005): Recent updates on the role of chemotherapy in pancreatic cancer. *Semin Oncol* 32 (4 Suppl 6): S1-3.

CCDS Database:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi?REQUEST=CCDS&DATA=CCDS31012> (17.2.2011).

Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R (1997): The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (12): 6307-12.

Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, DePinho RA (2007): Stromal biology of pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 101 (4): 887-907.

Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH (1984): Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133 (1): 157-65.

Classen M, Diehl V, Kochsiek W, Berdel WE, Böhm M, Schmiegel W: *Innere Medizin, München und Jena* (2004).

Cohen SJ, Pinover WH, Watson JC, Meropol NJ (2000): Pancreatic cancer. *Curr Treat Options Oncol* 1 (5): 375-86.

Condeelis J, Pollard JW (2006): Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124 (2): 263-6.

Coqueret O, Berube G, Nepveu A (1996): DNA binding by cut homeodomain proteins is down-modulated by protein kinase C. *J Biol Chem* 271 (40): 24862-8.

Coqueret O, Berube G, Nepveu A (1998): The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase. *EMBO J* 17 (16): 4680-94.

de Braud F, Cascinu S, Gatta G (2004): Cancer of pancreas. *Crit Rev Oncol Hematol* 50 (2): 147-55.

De Wever O, Mareel M (2003): Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol* 200 (4): 429-47.

Deutsche Krebsgesellschaft e.V.:

http://www.krebsgesellschaft.de/bauchspeicheldruesenkrebs_therapie,4109.html

(18.2.2009).

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 (6836): 494-8.

Ellenrieder V, Hendler SF, Ruhland C, Boeck W, Adler G, Gress TM (2001): TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int J Cancer* 93 (2): 204-11.

Entschladen F, Drell T 4th, Lang K, Masur K, Palm D, Bastian P, Niggemann B, Zaenker KS (2005): Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res* 307 (2): 418-26.

Esposito I, Menicagli M, Funel N, Bergmann F, Boggi U, Mosca F, Bevilacqua G, Campani D (2004): Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 57 (6): 630-6.

European Bioinformatics Institute (EBI):

http://www.ebi.ac.uk/gxa/gene/ENSMUSG00000029705?ef=cell_type (20.6.2011).

Fackler MJ, Civin CI, May WS (1992): Up-regulation of surface CD34 is associated with protein kinase C-mediated hyperphosphorylation of CD34. *J Biol Chem* 267 (25): 17540-6.

Farrow B, Albo D, Berger DH (2008): The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cancer. *J Surg Res* 149 (2): 319-28.

Felschow DM, McVeigh ML, Hoehn GT, Civin CI, Fackler MJ (2001): The adapter protein CrkL associates with CD34. *Blood* 97 (12): 3768-75.

Fernandez M, Simon V, Minguell JJ (2000): Production of soluble CD34 by human myeloid cells. *Br J Haematol* 111 (2): 426-31.

Fujita H, Ohuchida K, Mizumoto K, Egami T, Miyoshi K, Moriyama T, Cui L, Yu J, Zhao M, Manabe T, Tanaka M (2009): Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance proliferation of human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Sci* 100 (12): 2309-17.

Ghadirian P, Lynch HT, Krewski D (2003): Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* 27 (2): 87-93.

Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP (2008): Biology and management of pancreatic cancer. *Postgrad Med J* 84 (995): 478-97.

Goulet B, Watson P, Poirier M, Leduy L, Berube G, Meterissian S, Jolicoeur P, Nepveu A (2002): Characterization of a tissue-specific CDP/Cux isoform, p75, activated in breast tumor cells. *Cancer Res* 62 (22): 6625-33.

Goulet B, Truscott M, Nepveu A (2006): A novel proteolytically processed CDP/Cux isoform of 90 kDa is generated by cathepsin L. *Biol Chem* 387 (9): 1285-93.

Harada R, Berube G, Tamplin OJ, Denis-Larose C, Nepveu A (1995): DNA-binding specificity of the cut repeats from the human cut-like protein. *Mol Cell Biol* 15 (1): 129-40.

Hartel M, Di Mola FF, Gardini A, Zimmermann A, Di Sebastiano P, Guweidhi A, Innocenti P, Giese T, Giese N, Buchler MW, Friess H (2004): Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior. *World J Surg* 28 (8): 818-25.

He XY, Antao VP, Basila D, Marx JC, Davis BR (1992): Isolation and molecular characterization of the human CD34 gene. *Blood* 79 (9): 2296-302.

Hohenberger W, Kastl S (2000): Neoadjuvante und adjuvante Therapie des duktaalen Pankreaskarzinoms. *Zentralbl Chir* 125 (4): 348-55.

Hong S, Lee H, Kim SJ, Hahm K (2010): Connection between inflammation and carcinogenesis in gastrointestinal tract: focus on TGF-beta signaling. *World J Gastroenterol* 16 (17): 2080-93.

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J, Offerhaus GJ (2001): Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 25 (5): 579-86.

Human Genome Organisation:

www.genenames.org/data/hgnc_data.php?hgnc_id=2257 (26.11.2010).

Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M (2005): Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 92 (11): 2076-83.

Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD (2008): Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 68 (3): 918-26.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007): Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57 (1): 43-66.

Jesnowski R, Furst D, Ringel J, Chen Y, Schrodel A, Kleeff J, Kolb A, Schareck WD, Lohr M (2005): Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab Invest* 85 (10): 1276-91.

Kakinuma T, Hwang ST (2006): Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 79 (4): 639-51.

Kikuta K, Masamune A, Watanabe T, Ariga H, Itoh H, Hamada S, Satoh K, Egawa S, Unno M, Shimosegawa T (2010): Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 403 (3-4): 380-4.

Kim SC (2008): Surgical management of pancreatic cancer. *Korean J Gastroenterol* 51 (2): 89-100.

Kitamura M (1997): Identification of an inhibitor targeting macrophage production of monocyte chemoattractant protein-1 as TGF-beta 1. *J Immunol* 159 (3): 1404-11.

Kleeff J, Kusama T, Rossi DL, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, Buchler MW, Zlotnik A, Korc M (1999): Detection and localization of Mip-3alpha/LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 81 (4): 650-7.

Kleeff J, Beckhove P, Esposito I, Herzig S, Huber PE, Lohr JM, Friess H (2007): Pancreatic cancer microenvironment. *Int J Cancer* 121 (4): 699-705.

Kleinman HK, Jacob K (2001): Invasion assays. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 12: Unit 12.2.

Koorstra JM, Hustinx SR, Offerhaus GJA, Maitra A (2008): Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* 8 (2): 110-25.

Korc M (2007): Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am J Surg* 194 (4 Suppl): S84-6.

Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M (2000): Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* 6 (9): 3530-5.

Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS (1994): Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. Blood 84 (3): 691-701.

Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996): CD34: structure, biology, and clinical utility. Blood 87 (1): 1-13.

Kuroda N, Nakayama H, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Hiroi M, Enzan, H (2004): Distribution and role of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in human normal testicular stroma. Histol Histopathol 19 (3): 743-51.

Lanza F, Healy L, Sutherland DR (2001): Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. J Biol Regul Homeost Agents 15 (1): 1-13.

Leon Avery:

<http://elegans.swmed.edu/~leon/stats/utest.html> (30.11.2010).

Lewis CE, Pollard JW (2006): Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. Cancer Res 66 (2): 605-12.

Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL (2004): Pancreatic cancer. Lancet 363 (9414): 1049-57.

Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL (2000): Pancreatic cancer: state-of-the-art care. CA Cancer J Clin 50 (4): 241-68.

Lockhart AC, Rothenberg ML, Berlin JD (2005): Treatment for pancreatic cancer: current therapy and continued progress. Gastroenterology 128 (6): 1642-54.

Lohr JM, Jesnowski R (2009): Pancreatic stellate cells and pancreatic carcinoma: an unholy alliance. JOP 10 (4): 472-3.

Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC (1997): Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. J Natl Cancer Inst 89 (6): 442-6.

Lowenfels AB, Maisonneuve P (2006): Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol 20 (2): 197-209.

Lynch HT, Brand RE, Deters CA, Fusaro RM (2001): Update on familial pancreatic cancer. Curr Gastroenterol Rep 3 (2): 121-8.

Mahadevan D, Von Hoff D (2007): Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. Mol Cancer Ther 6 (4): 1186-97.

Maisonneuve P, Lowenfels AB (2002): Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. Dig Dis 20 (1): 32-7.

Mantovani A, Allavena P, Sica A (2004): Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. Eur J Cancer 40 (11): 1660-7.

Martin-Soudant N, Drachman JG, Kaushansky K, Nepveu A (2000): CDP/Cut DNA binding activity is down-modulated in granulocytes, macrophages and erythrocytes but remains elevated in differentiating megakaryocytes. Leukemia 14 (5): 863-73.

Massague J (1998): TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 67: 753-91.

Massague J, Blain SW, Lo RS (2000): TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell 103 (2): 295-309.

Michl P, Barth C, Buchholz M, Lerch MM, Rolke M, Holzmann K, Menke A, Fensterer H, Giehl K, Lohr M, Leder G, Iwamura T, Adler Guido, Gress TM (2003): Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer. Cancer Res 63 (19): 6265-71.

Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, Warne PH, Wagner M, Poulsom R, D'Arrigo C, Ryder K, Menke A, Gress TM, Downward J (2005): CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 7 (6): 521-32.

Michl P, Downward J (2006a): CUTL1: a key mediator of TGFbeta-induced tumor invasion. *Cell Cycle* 5 (2): 132-4.

Michl P, Knobel B, Downward J (2006b): CUTL1 is phosphorylated by protein kinase A, modulating its effects on cell proliferation and motility. *J Biol Chem* 281 (22): 15138-44.

Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, Tashiro S (2004): Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas* 28 (1): 38-44.

Miyamoto M, Shimizu Y, Okada K, Kashii Y, Higuchi K, Watanabe A (1998): Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 47 (1): 47-57.

Monti P, Leone BE, Marchesi F, Balzano G, Zerbi A, Scaltrini F, Pasquali C, Calori G, Pessi F, Sperti C, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L (2003): The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. *Cancer Res* 63 (21): 7451-61.

Montuenga LM, Pio R (2007): Tumour-associated macrophages in nonsmall cell lung cancer: the role of interleukin-10. *Eur Respir J* 30 (4): 608-10.

Mülhardt, Cornel: *Der Experimentator: Molekularbiologie*. Heidelberg (2000).

Mueller MM, Fusenig NE (2002): Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 70 (9-10): 486-97.

Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse M, Sebens T, Kloppel G, Kalthoff H, Folsch UR, Schafer H (2004): Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res* 64 (4): 1331-7.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000): International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52 (1): 145-76.

Nepveu A (2001): Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* 270 (1-2): 1-15.

Neufeld EJ, Skalnik DG, Lievens PM, Orkin SH (1992): Human CCAAT displacement protein is homologous to the Drosophila homeoprotein, cut. *Nat Genet* 1 (1): 50-5.

Nimphius W, Moll R, Olbert P, Ramaswamy A, Barth PJ (2007): CD34+ fibrocytes in chronic cystitis and noninvasive and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Virchows Arch* 450 (2): 179-85.

Nirodi C, Hart J, Dhawan P, Moon NS, Nepveu A, Richmond A (2001): The role of CDP in the negative regulation of CXCL1 gene expression. *J Biol Chem* 276 (28): 26122-31.

Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999): Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 59 (19): 5002-11.

Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ (2007): The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 117 (1): 50-9.

Pollard JW (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4 (1): 71-8.

Porta C, Subhra KB, Larghi P, Rubino L, Mancino A, Sica A (2007): Tumor promotion by tumor-associated macrophages. *Adv Exp Med Biol* 604: 67-86.

Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, Ruiz L, Jariod M, Costafreda S, Coll S, Alguacil J, Corominas JM, Sola R, Salas A, Real FX (2005): Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol* 7 (5): 189-97.

Protiva P, Sahai AV, Agarwal B (2001): Endoscopic ultrasonography in the diagnosis and staging of pancreatic neoplasms. *Int J Gastrointest Cancer* 30 (1-2): 33-45.

Qian L, Mizumoto K, Maehara N, Ohuchida K, Inadome N, Saimura M, Nagai E, Matsumoto K, Nakamura T, Tanaka M (2003): Co-cultivation of pancreatic cancer cells with orthotopic tumor-derived fibroblasts: fibroblasts stimulate tumor cell invasion via HGF secretion whereas cancer cells exert a minor regulative effect on fibroblasts HGF production. *Cancer Lett* 190 (1): 105-12.

Quiagen:

http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/PCRAndReverseTranscription/KitsAndEnzymes/DE/RTPCR_Omniscript_DE/1015753_HBOmniRTV209_00de.pdf
(20.03.2009).

Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A (2007): Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 256 (2): 137-65.

Rehm, Hubert: *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*. Heidelberg (2002).

Rieder H, Bartsch DK (2004): Familial pancreatic cancer. *Fam Cancer* 3 (1): 69-74.

Ripka S, König A, Buchholz M, Wagner M, Sipos B, Kloppel G, Downward J, Gress TM, Michl P (2007): WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 28 (6): 1178-87.

Roberts AB, Wakefield LM (2003): The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (15): 8621-3.

Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ (1996): Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 76 (1): 69-125.

Ryu B, Jones J, Hollingsworth MA, Hruban RH, Kern SE (2001): Invasion-specific genes in malignancy: serial analysis of gene expression comparisons of primary and passaged cancers. *Cancer Res* 61 (5): 1833-8.

SABiosciences:

<http://www.superarray.com/pcrarraxdataanalysis.php> (18.12.2008).

Saif MW, Karapanagiotou L, Syrigos K (2007): Genetic alterations in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 13 (33): 4423-30.

Sansregret L, Goulet B, Harada R, Wilson B, Leduy L, Bertoglio J, Nepveu A (2006): The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase. *Mol Cell Biol* 26 (6): 2441-55.

Sansregret L, Nepveu A (2008): The multiple roles of CUX1: insights from mouse models and cell-based assays. *Gene* 412 (1-2): 84-94.

Santaguida M, Ding Q, Berube G, Truscott M, Whyte P, Nepveu A (2001): Phosphorylation of the CCAAT displacement protein (CDP)/Cux transcription factor by cyclin A-Cdk1 modulates its DNA binding activity in G(2). *J Biol Chem* 276 (49): 45780-90.

Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG (1992): Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics* 12 (4): 788-94.

Seoane J (2006): Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. *Carcinogenesis* 27 (11): 2148-56.

Seton-Rogers SE, Brugge JS (2004): ErbB2 and TGF-beta: a cooperative role in mammary tumor progression? *Cell Cycle* 3 (5): 597-600.

Shen W, Zhou J, Broussard SR, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW (2002): Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor. *Cancer Res* 62 (16): 4746-56.

Shi Q, Abbruzzese JL, Huang S, Fidler IJ, Xiong Q, Xie K (1999): Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin Cancer Res* 5 (11): 3711-21.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006): Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42 (6): 717-27.

Sica A, Allavena P, Mantovani A (2008a): Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 267 (2): 204-15.

Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A (2008b): Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18 (5): 349-55.

Silverthorn DE: Physiologie. München (2009).

Siomi H, Siomi MC (2009): On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457 (7228): 396-404.

Sohn TA (2002): The molecular genetics of pancreatic ductal carcinoma. *Minerva Chir* 57 (5): 561-74.

Strefford JC, Foot NJ, Chaplin T, Neat MJ, Oliver RT, Young BD, Jones LK (2001): The characterisation of the lymphoma cell line U937, using comparative genomic hybridisation and multi-plex FISH. *Cytogenet Cell Genet* 94 (1-2): 9-14.

Sundstrom C, Nilsson K (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17 (5): 565-77.

Tajima T, Murata T, Aritake K, Urade Y, Hirai H, Nakamura M, Ozaki H, Hori M (2008): Lipopolysaccharide induces macrophage migration via prostaglandin D(2) and prostaglandin E(2). *J Pharmacol Exp Ther* 326 (2): 493-501.

Tonouchi H, Miki C, Tanaka K, Kusunoki M (2002): Profile of monocyte chemoattractant protein-1 circulating levels in gastric cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 37 (7): 830-3.

Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S (2005): Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep* 14 (2): 425-31.

van Wijnen AJ, van Gurp MF, de Ridder MC, Tufarelli C, Last TJ, Birnbaum M, Vaughan PS, Giordano A, Krek W, Neufeld EJ, Stein JL, Stein GS (1996): CDP/cut is the DNA-binding subunit of histone gene transcription factor HiNF-D: a mechanism for gene regulation at the G1/S phase cell cycle transition point independent of transcription factor E2F. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (21): 11516-21.

von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Burde R, Plath T, Schirner M, Heidenreich R, Breier G, Riecken EO, Wiedenmann B, Rosewicz S (2000): De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop. *Gastroenterology* 119 (5): 1358-72.

Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, Toi CS, Pirola RC, Wilson JS, Goldstein D, Apte MV (2008a): Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 68 (7): 2085-93.

Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV (2008b): Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance. *Cancer Res* 68 (19): 7707-10.

Wikipedia:

<http://de.wikipedia.org/wiki/Immunhistochemie> (15.03.2009).

Wray CJ, Ahmad SA, Matthews JB, Lowy AM (2005): Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice. *Gastroenterology* 128 (6): 1626-41.

Wu C, Lee Y, Wang T, Lee L, Kong W, Chen E, Wei M, Liang Y, Hwang T (2006): Identification of differential gene expression between intestinal and diffuse gastric cancer using cDNA microarray. *Oncol Rep* 15 (1): 57-64.

Yeo TP: *Pancreatic cancer*. St. Louis (2002).

Yoon SO, Chikaraishi DM (1994): Isolation of two E-box binding factors that interact with the rat tyrosine hydroxylase enhancer. *J Biol Chem* 269 (28): 18453-62.

Zalatnai A (2006): Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Curr Mol Med* 6 (6): 685-93.

Zipin-Roitman A, Meshel T, Sagi-Assif O, Shalmon B, Avivi C, Pfeffer RM, Witz IP, Ben-Baruch A (2007): CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 67 (7): 3396-405.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen und Einheiten

A1. Abkürzungen

%	Prozent
A	Absorption
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BRCA2	Breast Cancer 2
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
ca.	circa
cDNA	komplementär DNA
CDP	CCAAT- Displacement Protein
CUX1/CUTL1/CDP	Cut-like Homeobox 1
Ct	Cycle Threshold
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonucleosid-Triphosphate
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
Dr.	Doktor
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures
ECL	Enhanced Chemiluminescence Reagenz
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin Tetraacetat
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FAMM-Syndrom	familiäres atypisches Nävus- und Melanom-Syndrom

FCS	fetales calf serum
for	vorwärts
GER	Germany
HCl	Chlorwasserstoff
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
H ₂ O	Wasserstoffdioxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER-2	human epidermal growth factor receptor
HNPCC	hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom
HRP	Horse Radish Peroxidase
HUGO	Human Genome Organization
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogencarbonat
kb	Kilo-Base
kDa	Kilo-Dalton
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
med.	Medizin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumphosphat
OD	optische Dichte
p16	Protein 16
p53	Protein 53
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
Prof.	Professor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rev	revers
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interference
mRNA	messenger RNA
PD	Privatdozent
PVDF	Polyvinylidendifluorid
q	langer Arm eines Chromosoms
rpm	rounds per minute

RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
MADH4/SMAD4	Signaling mother against decapentaplegic peptide
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	transforming growth factor beta
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton-X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
USA	United States of America
z. B.	zum Beispiel

A2. Abkürzungen, der im Rahmen der Genexpressionsanalysen analysierten Chemokine, Zytokine und Rezeptoren

Abcf1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1
Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6
Cxcr5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
C3	Complement component 3
Casp1	Caspase 1
Ccl1	Chemokine (C-C motif) ligand 1
Ccl11	Small chemokine (C-C motif) ligand 11
Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12
Ccl17	Chemokine (C-C motif) ligand 17
Ccl19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20
Ccl22	Chemokine (C-C motif) ligand 22
Ccl24	Chemokine (C-C motif) ligand 24
Ccl25	Chemokine (C-C motif) ligand 25
Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
Ccl6	Chemokine (C-C motif) ligand 6
Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7
Ccl8	Chemokine (C-C motif) ligand 8
Ccl9	Chemokine (C-C motif) ligand 9
Ccr1	Chemokine (C-C motif) receptor 1

Ccr2	Chemokine (C-C motif) receptor 2
Ccr3	Chemokine (C-C motif) receptor 3
Ccr4	Chemokine (C-C motif) receptor 4
Ccr5	Chemokine (C-C motif) receptor 5
Ccr6	Chemokine (C-C motif) receptor 6
Ccr7	Chemokine (C-C motif) receptor 7
Ccr8	Chemokine (C-C motif) receptor 8
Ccr9	Chemokine (C-C motif) receptor 9
Crp	C-reactive protein, pentraxin-related
Cx3cl1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Cxcl11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Cxcl13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13
Cxcl15	Chemokine (C-X-C motif) ligand 15
Pf4	Platelet factor 4
Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Cxcr3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
Ccr10	Chemokine (C-C motif) receptor 10
Ifng	Interferon gamma
Il10	Interleukin 10
Il10ra	Interleukin 10 receptor, alpha
Il10rb	Interleukin 10 receptor, beta
Il11	Interleukin 11
Il13	Interleukin 13
Il13ra1	Interleukin 13 receptor, alpha 1
Il15	Interleukin 15
Il16	Interleukin 16
Il17b	Interleukin 17B
Il18	Interleukin 18
Il1a	Interleukin 1 alpha
Il1b	Interleukin 1 beta
Il1f6	Interleukin 1 family, member 6
Il1f8	Interleukin 1 family, member 8
Il1r1	Interleukin 1 receptor, type I
Il1r2	Interleukin 1 receptor, type II

Il20	Interleukin 20
Il2rb	Interleukin 2 receptor, beta chain
Il2rg	Interleukin 2 receptor, gamma chain
Il3	Interleukin 3
Il4	Interleukin 4
Il5ra	Interleukin 5 receptor, alpha
Il6ra	Interleukin 6 receptor, alpha
Il6st	Interleukin 6 signal transducer
Il8rb	Interleukin 8 receptor, beta
Itgam	Integrin alpha M
Itgb2	Integrin beta 2
Lta	Lymphotoxin A
Ltb	Lymphotoxin B
Mif	Macrophage migration inhibitory factor
Scye1	Small inducible cytokine subfamily E, member 1
Spp1	Secreted phosphoprotein 1
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
Tnf	Tumor necrosis factor
Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
Tnfrsf1b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b
Cd40lg	CD40 ligand
Tollip	Toll interacting protein
Xcr1	Chemokine (C motif) receptor 1
Gusb	Glucuronidase, beta
Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
Hsp90ab1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

B. Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunden
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Mol
min	Minuten
mA	Milliampère
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimol
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
rpm	revolutions per minute
U	Unit
V	Volt

8.2 Abbildungen und Tabellen

8.2.1 Abbildungen

Abb. 1.1 Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms.

Abb. 1.2 Interaktion zwischen Pankreaskarzinomzellen und Zellen des Tumorstromas.

Abb. 1.3 Tumorunterstützende Funktionen von TAM und das Zusammenspiel mit den Tumorzellen.

Abb. 1.4 Duale Rolle von TGF- β .

Abb. 1.5 Isoformen von CUX1, deren DNA-Bindungsaktivität und Wirkung auf die Transkription.

Abb. 1.6 Funktionen von CUX1 in Zusammenhang mit dem TGF- β Signalweg.

Abb. 3.1 Schema der Herstellung von cDNA.

Abb. 3.2 Prinzip eines Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay.

Abb. 3.3 Schemazeichnung des Versuchsaufbaus eines Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay.

Abb. 3.4 Prinzip der Immunfluoreszenz.

Abb. 4.1 Mesenchymale Stromazellen und Panc1-Zellen im unteren Kompartiment eines Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay führen zu einer erhöhten Migration von Pankreaskarzinomzellen.

Abb. 4.2 Fibroblasten zeigen 24 h nach transienter Transfektion eine hohe Expression von CD34.

Abb. 4.3 Die stabile Transfektion von Fibroblasten mit CD34 bewirkt eine Erhöhung der Gesamtproteinmenge von CD34.

Abb. 4.4 Kein verändertes Migrationsverhalten der Suit007-Zellen durch CD34⁺-Fibroblasten.

Abb. 4.5 Inkubation von Suit007-Zellen mit Medium von CD34⁺-Fibroblasten hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Moderate, nicht signifikante, Zunahme der Proliferation bei 48 h Inkubation mit 10% FCS-haltigem konditioniertem Medium.

Abb. 4.6 CUX1-Expression in Makrophagen bzw. Monozyten und mesenchymalen Stromazellen.

Abb. 4.7 Kein verändertes Migrationsverhalten der Panc1-Zellen bei Repression von CUX1 in mesenchymalen Stromazellen.

Abb. 4.8 Zeitabhängige Veränderung der CUX1-Expression in U937- und J774.A1-Zellen durch TGF- β .

Abb. 4.9 Erniedrigte Migrationsrate der Panc1-Zellen bei Repression von CUX1 in J774.A1-Makrophagen.

Abb. 4.10 Keine Veränderung der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen (Panc1-Zellen) bei Repression von CUX1 in J774.A1-Zellen.

Abb. 4.11 Signifikante Überexpression von 34 verschiedenen Genen bei Repression von CUX1 in J774.A1-Makrophagen.

8.2.2 Tabellen

Tab. 3.1 Zelllinien

Tab. 3.2 Master Mix für Transfektion mit TransmessengerTM-Transfektionsreagenz

Tab. 3.3 Aufbau eines Western-Blot

Tab. 3.4 Schema einer dreiphasigen PCR (40 Zyklen)

Tab. 3.5 Stimulationsversuche mit TGF- β

Tab. 3.6 Schema eines Boyden-Kammer-Chemotaxis-Assay

Tab. 3.8 Schema eines BrdU-Assay

Tab. 3.9 Schema eines CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay

8.3 Lebenslauf

Die Seiten 102-103 enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg:

Aigner, Alter, Aumüller, Barth, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Becker, Bentrup, Berger, Bernhardt, Boekhoff, Bolm, Braun, Brehm, Brendel, Buchholz, Burchert, Cetin, Clemens, Czubayko, Daut, del Rey, Diedrich, Dietz, Dinges, Dittrich, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eilers, Eickmann, Ellenrieder, Elsaesser, Fensterer, Feuser, Frietsch, Giese, Göke, Görg, Görg, Graf, Gress, Grimm, Groh, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hahn, Hasilik, Heinis, Hertel, Hörsch, Höffken, Hofmann, Horn, Hoyer, Hundt, Jacke, Jennemann, Kalinowsky, Kann, Karger, Karatolios, Keller, Kill, Klose, Koch, Köhler, Koolman, Kratz, Klingmüller, Krebber, Kretschmer, Köhler, Kroh, Kunsch, Kuhlmann, Lang, Lange, Leonhardt, Lill, Liss, Löffler, Löffler, Lohoff, Ludwig, Lürs, Maier, Maisch, Maisner, Mann, Mayer, Metzelder, Michl, Mittag, Moll, Moosdorf, Morin, Mueller, Müller, Mutters, Neeße, Netter, Neubauer, Nimphius, Nguyen, Oeffner, Oertel, Pagenstecher, Pfestroff, Preuss, Printz, Ramaswamy, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Röhm, Rominger, Rose, Rosenow, Rothmund, Rüscher, Sattler, Sahmland, Schäfer, Schmid, Schmidt, Seifart, Seitz, Seyberth, Sommer, Strauch, Steiniger, Steinfeldt, Steinkamp, Stiletto, Sundermeyer, Suske, Vogelmeier, Voigt, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Wesemann, Westermann, Westerman, Westhoff, Wiegandt, Wulf, Zentgraf

In Bad Homburg und Bad Nauheim:

Etzrodt, Hansen, Heckl, Höer, Hölschermann, Kock, Lang, Lischke, Rohr, Sanner, Müller-Ladner, Lange

8.5 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, bei denen ich mich herzlich bedanken möchte:

Herrn Prof. Dr. med. Th. M. Gress danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Patrick Michl für die Vergabe dieses interessanten, sowie spannenden Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Seine in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung, Gesprächsbereitschaft, Anregungen und die konstruktive Kritik bei der schriftlichen Ausarbeitung haben diese Dissertation erst ermöglicht. Vielen Dank!

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Barth für die Überlassung des Themas bezüglich CD34 und Bereitstellung des CD34 tragenden Plasmids bedanken. Danke für die gute Kooperationsarbeit mit Ihrer Arbeitsgruppe.

Mein weiterer Dank gebührt den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe PD Dr. Patrick Michl und den Mitarbeitern des Labors. Insbesondere danken möchte ich Eva, für die hervorragende Einarbeitung und die Assistenz bei den experimentellen Arbeiten, die immer ein offenes Ohr bei größeren und kleineren Problemen des Laboralltags hatte und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Aber auch danke an Steffi, Jan, Benjamin und Lisa für das gute Arbeitsklima und den regen Gedankenaustausch.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Sandra und Gerold für das Einlesen in ein unbekanntes Thema und die vielen hilfreichen Korrekturen, ohne die diese Arbeit nur halb so gut geworden wäre.

Insbesondere möchte ich meinem Freund Daniel danken, der mich für eine lange Zeit mit der Zellkultur und dem Computer teilen musste, der immer für mich da war und mich ermutigt hat, trotz manchen Durchhängers, das Ziel Dissertation nicht aus den Augen zu verlieren. Danke!

Ein großes Dankeschön gilt zu dem meinen Freunden und Kommilitonen, die mich stets unterstützten und mir den Rücken frei hielten, wenn ich mich mal wieder ins Labor verabschiedet habe. Außerdem meiner Familie, die so manche Laune ertrug, wenn die Versuche oder das Schreiben mal nicht so klappte, wie ich wollte.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung und das Vertrauen auf meinem Lebensweg, die mir so die Möglichkeit gaben, meine Ziele zu erreichen und Träume zu erfüllen.

8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Wirkung von CUX1 und CD34 in Stromazellen auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinom-Zelllinien“ in der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel unter Leitung von Prof. Dr. med. Th. M. Gress ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Mörfelden-Walldorf, 11.10.2011